L-GLYCERIN-3-PHOSPHAT DEHYDROGENASE (E.C. 1.1.1.8) AUS DUNALIELLA TERTIOLECTA UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE OSMOREGULATION DER GLYCERINSYNTHESE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Manuel Haus
aus Hammelburg

~~1984~~
1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

L-GLYCERIN-3-PHOSPHAT DEHYDROGENASE (E.C. 1.1.1.8) AUS DUNALIELLA TERTIOLECTA UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE OSMOREGULATION DER GLYCERINSYNTHESE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Manuel Haus

aus Hammelburg

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.83

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Wegmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr.Dr.h.c. H. Metzner

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Abstract

HAUS, MANUEL:

L-GLYCERIN-3-PHOSPHAT DEHYDROGENASE (E.C. 1.1.1.8) AUS DUNALIELLA TERTIOLECTA UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE OSMOREGULATION DER GLYCERINSYNTHESE

Die einzellige Meeresalge *Dunaliella tertiolecta* besitzt einen weiten Toleranzbereich gegen osmotisch aktive Substanzen im Außenmedium. Für NaCl umfaßt dieser Bereich Konzentrationen von 16 mM bis 5,6 M. *Dunaliella* besitzt keine Vakuolen und keine Zellwand; die Zellmembran ist semipermeabel. Bei Erhöhung des osmotischen Wertes im Außenmedium wird der Kohlenstoff-Stoffwechsel der Algenzelle grundlegend umgesteuert. Durch eine sofort nach der osmotischen Belastung einsetzende Erhöhung der Glycerinsyntheserate wird innerhalb von einer Stunde das osmotische Gleichgewicht zwischen Algenzelle und Außenmedium wiederhergestellt.

Die Gründe für die Annahme, daß die Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase im Chloroplasten wesentlich an der Regulation der Glycerinsynthese beteiligt ist, werden diskutiert. Es werden verschiedene Isolierungsmethoden zur Reinigung der GPDH aus *Dunaliella* untersucht und eine schnelle 2-Schritt-Isolierung entwickelt. Die kinetischen Daten der GPDH werden ermittelt, und der Einfluß von Adenin-Nucleotiden, FBP, P_i und der Pufferzusammensetzung auf die Enzymaktivität werden untersucht. Aus Versuchen mit Trifluorperazin und EGTA kann eine Beteiligung von Ca^{2+}-Calmodulin an der Osmoregulation ausgeschlossen werden. Auf Grund der Aktivitätsänderung der GPDH bei Variation der Salzkonzentration im Bereich unter 200 mM und aus dem physiologischen Verhalten der Algenzelle bei Variation des osmotischen Druckes im Außenmedium wird ein Modell für die Osmoregulation der Glycerinsynthese entwickelt. Dieses Modell erklärt die Umsetzung eines Reizes (osmot. Druck) von der physikalischen auf die biochemische Ebene (Enzymregulation) und steht mit den bisher bekannten Ergebnissen in Übereinstimmung.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Wegmann für die Überlassung des Themas, seine ständige Bereitschaft zum Gespräch und nicht zuletzt für die Großzügigkeit, die er meiner Arbeitszeitplanung, und das Verständnis, das er meinen familiären Verpflichtungen entgegenbrachte.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wegmann und allen anderen Mitarbeitern des Institutes danke ich für das Engagement, mit dem sie sich mit meinen fachlichen Problemen auseinandersetzten, und für Ideen und Ideenaustausch.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Bisswanger danke ich für die Hilfestellung bei der Diskussion der enzymkinetischen Messungen.

Meiner Freundin und Gefährtin Frau Dr. Sybille Hartmann danke ich für ihre Geduld und ihre praktische und ideelle Unterstützung, vor allem während der Fertigstellung des Manuskripts, und für den ständigen Rückhalt, den ich bei Rückschlägen während der Arbeit bei ihr fand.

Verzeichnis der Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
DCMU	3(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G-3-P	Glycerin-3-phosphat
GDH	Glycerin Dehydrogenase
GPase	Glycerin-3-phosphat Phosphatase
GPDH	Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
KPP	Kaliumphosphatpuffer
NAD^+	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduziert
$NADP^+$	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
$1,3\text{-}P_2GA$	1,3-Diphosphoglycerinsäure
3-PGA	3-Phosphoglycerinsäure
P_i	anorganisches Phosphat
TRAP	Triethanolaminpuffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547619_0004

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Materialien	9
2.2.	Methoden	9
2.2.1.	Kultur der Algen	9
2.2.2.	Aufschlußmethoden	11
2.2.2.1.	Aufschluß im BÜHLER-Homogenator	11
2.2.2.2.	Aufschluß mit Glasperlen im Zentrifugenglas	11
2.2.2.3.	Aufschluß durch Ultraschall-Behandlung	12
2.2.2.4.	Gewinnung der Rohextrakte	12
2.2.3.	Chlorophyllbestimmung nach RÖBBELEN	12
2.2.4.	Proteinbestimmung nach BRADFORD	13
2.2.4.1.	Herstellung der Färbelösung	13
2.2.4.2.	Durchführung der Bestimmung	13
2.2.5.	Aktivitätsbestimmung der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	14
2.2.5.1.	G-3-P Oxidation	14
2.2.5.2.	DHAP-Reduktion	14
2.2.6.	Phosphatbestimmung nach FISKE-SUBBAROW	14
2.2.6.1.	Lösungen	14
2.2.6.2.	Durchführung der Bestimmung	15
2.2.7.	Stabilisierung der G-3-P Dehydrogenase	15
2.2.7.1.	Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen zum Rohextrakt	15
2.2.7.2.	Zusatz von Polyelektrolyten	15
2.2.7.2.1.	BSA	15
2.2.7.2.2.	Nucleinsäure	16
2.2.7.3.	Lichtschutz	16
2.2.7.3.1.	Stabilitätskurve im Dunkeln	16
2.2.7.3.2.	Hell-Dunkel-Vergleich in verschiedenen Puffern	16

Seite

2.2.7.3.3. Belichtung der Enzymlösung bei verschiedenen Wellenlängen 17
2.2.8. Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose Cl-6B 17
2.2.9. Phosphatbestimmung an AMP-Sepharose 18
2.2.10. Messung der 5'-Nucleotidase im Rohextrakt nach HEPPEL und HILMOE 18
2.2.11. Versuche zur Hemmung und Abtrennung der Nucleotidase im Rohextrakt 19
2.2.11.1. Hemmung durch Fluorid 19
2.2.11.2. Hemmung durch Fluorid, Silikat und Komplexbildner 19
2.2.11.3. Versuche zur Abtrennung der Nucleotidase aus dem Rohextrakt 19
2.2.12. Phosphat-Gehalt von Algenzellen 20
2.2.12.1. Phosphat-Gehalte von Algen im osmotischen steady state 20
2.2.12.2. Phosphat-Gehalt von Algen während der Osmoregulation 21
2.2.13. Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen 21
2.2.14. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex 22
2.2.14.1. Vorversuche 22
2.2.14.2. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25 22
2.2.14.3. Messung der Desorptionskonzentration von NaCl 23
2.2.14.4. Stufenelution der DEAE-Sephadex A-25 Säule 23
2.2.15. Einfluß von G-3-P auf die Aktivität der GPDH 23
2.2.16. Chromatographie an Hydroxyapatit 24
2.2.16.1. Herstellung von Hydroxyapatit nach BERNARDI 24
2.2.16.2. Vorversuch 24
2.2.16.3. Elution mit Glycerin-3-Phosphat 25
2.2.16.4. Gradientenelution mit G-3-P 25
2.2.17. Konzentrierung des Enzyms mit trockenem Sephadex 25

Seite

2.2.18. Affinitätschromatographie an Cibacron blue Sepharose Cl 6 B (Blausepharose) 26

2.2.18.1. Vorversuche zur Bindung von GPDH aus dem Rohextrakt an Blau-Sepharose 26

2.2.18.2. Enzymtest mit Dextranblau 2000 26

2.2.18.3. Chromatographie von Eluaten der Hydroxyapatitsäule an Blausepharose 27

2.2.18.3.1. Batch-Versuch 27

2.2.18.3.2. Chromatographie mit 150 mM G-3-P 27

2.2.18.3.3. Chromatographie ohne G-3-P 27

2.2.18.3.4. Unspezifische Desorption von der Blausepharose 28

2.2.19. Affinitätschromatographie an Blausepharose aus dem Rohextrakt 28

2.2.19.1. Optimierungsversuche 28

2.2.19.2. Optimierte Reinigung der GPDH an Blausepharose 30

2.2.20. Entfernung von Substrat und Coenzym aus den Eluaten der Blausepharosesäule 30

2.2.20.1. Entfernung von G-3-P mit DEAE-Sephadex 30

2.2.20.2. Entfernung von G-3-P und NAD mit Sephadex G-50 30

2.2.21. Bestimmung der kinetischen Konstanten der GPDH 31

2.2.21.1. Oxidation von Glycerin-3-Phosphat 31

2.2.21.2. Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat 31

2.2.22. Hemmkinetiken 32

2.2.23. Untersuchung der pH-Abhängigkeit und Salzabhängigkeit der Enzymaktivität 33

2.2.23.1. pH-Abhängigkeit der G-3-P Oxidation 33

2.2.23.2. pH-Abhängigkeit der DHAP-Reduktion in verschiedenen Puffersystemen 33

2.2.23.3. pH-Abhängigkeit der DHAP-Reduktion bei verschiedenen Pufferkonzentrationen 33

2.2.23.4. Einfluß der Salzkonzentration auf die Aktivität 34

Seite

2.2.23.5. Einfluß verschiedener Puffersysteme und -konzentrationen 34

2.2.23.6. Einfluß verschiedener Dicarbonsäuren 34

2.2.23.7. Einfluß von Mannit auf die Aktivität der GPDH 35

2.2.24. Einfluß von Trifluoperazin und EGTA auf die Glycerinsynthese in *Dunaliella* 35

2.2.25. Einfluß von Trifluoperazin auf die $^{14}CO_2$-Fixierung unter osmotischer Belastung 36

3. ERGEBNISSE 38

3.1. Aufschlußmethoden 38

3.1.1. Glasperlenhomogenisation in verschiedenen Puffern 38

3.1.2. Ultraschallaufschluß 38

3.2. Stabilisierung der GPDH 39

3.2.1. Stabilisierung durch Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen zum Rohextrakt 39

3.2.2. Stabilisierung durch Zusatz von Polyelektrolyten 40

3.2.3. Stabilisierung durch Lichtschutz 41

3.2.3.1. Stabilitätskurve im Dunkeln 41

3.2.3.2. Hell-Dunkel-Vergleich der GPDH-Aktivität in verschiedenen Puffern 41

3.2.3.3. Beleuchtung der Enzymlösung 42

3.3. Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose Cl 6B 44

3.4. Phosphatbestimmung am Säulenmaterial 46

3.5. Aktivitätsbestimmung der 5'-Nucleotidase im Rohextrakt 47

3.6. Versuche zur Hemmung oder Entfernung der 5'-Nucleotidase 47

3.6.1. Hemmung der Nucleotidase durch Fluorid 47

3.6.2. Hemmung der Nucleotidase durch Fluorid, Silicat und Komplexbildner 48

3.6.3. Versuch der Abtrennung der Nucleotidase 48

		Seite
3.7.	Phosphatgehalt von *Dunaliella*-Zellen	49
3.7.1.	Phosphatgehalte von Algenzellen im osmotischen steady state	49
3.7.2.	Phosphatgehalte von Algen während der Osmoregulation	49
3.8.	Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen	51
3.9.	Chromatographie der GPDH an DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex	53
3.9.1.	Vorversuche	53
3.9.2.	Gradientenelution	53
3.9.3.	Bestimmung der Desorptionskonzentration mit NaCl	54
3.9.4.	Stufenelution der DEAE-Sephadex A-25 Säule	55
3.10.	Stabilisierung und Reaktivierung der GPDH durch Glycerin-3-Phosphat	55
3.11.	Chromatographie der GPDH an Hydroxyapatit	56
3.11.1.	Stufenelution mit Glycerin-3-Phosphat	56
3.11.2.	Gradientenelution mit Glycerin-3-Phosphat	58
3.12.	Affinitätschromatographie an Cibacron Blue Sepharose	59
3.12.1.	Vorversuche zur Bindung und Elution der GPDH aus dem Rohextrakt an Blausepharose	59
3.12.2.	Enzymtest mit Dextranblau	59
3.12.3.	Chromatographie von Eluaten der Hydroxy-apatitsäule an Blausepharose	60
3.13.	Versuch zur Konzentrierung der GPDH aus den Eluaten der Blausepharose-Säule	63
3.14.	Versuch zur Entfernung von G-3-P und NAD aus den Eluaten der Blausepharose-Säule	63
3.15.	Optimierung der Affinitätschromatographie an Blausepharose	64
3.16.	Regeneration der Blausepharose	67
3.17.	Entfernung von Substrat und Coenzym aus den Eluaten der Blausepharose-Säule	68
3.18.	Isolierung und Reinigung der GPDH aus *Dunaliella*	68
3.19.	Bestimmung der kinetischen Konstanten	69
3.20.	Bestimmung von Inhibitorkonstanten	73

Seite

3.20.1. Hemmung durch AMP 73

3.20.2. Hemmung durch ATP 74

3.20.3. Hemmung durch Phosphat 75

3.20.4. Einfluß von Fructose-Bisphosphat auf die GPDH-Aktivität 77

3.21. Abhängigkeit der GPDH-Aktivität vom pH und von der Art der Puffersubstanzen 79

3.22. Einfluß der Pufferkomponenten, Pufferkonzentration und Salzkonzentration auf die Enzymaktivität 81

3.23. Einfluß von Mannit auf die Aktivität der GPDH 84

3.24. Einfluß von Trifluoperazin und EGTA auf die Glycerinsynthese in *Dunaliella* 85

3.25. Einfluß von Trifluoperazin auf die $^{14}CO_2$-Fixierung unter osmotischer Belastung 86

4. DISKUSSION 87

5. ZUSAMMENFASSUNG 110

6. LITERATURVERZEICHNIS 112

1. EINLEITUNG

Für viele Organismen in ariden und semiariden Gebieten, wie auch im Meer, im Spritzwasser- und Brackwasserbereich, besteht das Problem des Überlebens im Ertragen hoher und wechselnder Salzgehalte des sie umgebenden Mediums.

Obligat halophile Organismen, wie z.B. einige Bakterien, besitzen halophile Enzymsysteme. Dies bedeutet, daß die Stoffwechselkatalysatoren nur bei hohem Salzgehalt der Zelle optimal arbeiten.

Im Unterschied dazu besitzen die sogenannten halotoleranten Organismen keine halophilen Enzyme. Für sie ist es daher notwendig, den Salzgehalt im Zellinneren niedrig zu halten. Das kann einerseits dadurch geschehen, daß das einströmende Salz aus der Zelle heraustransportiert wird, wie z.B. bei *Limonium* durch Salzdrüsen (THOMSON, 1975) oder bei *Chlamydomonas* durch eine pulsierende Vakuole. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Zellmembran eine Diffusionssperre darstellt, die das Salz gar nicht erst in die Zelle eindringen läßt.

Von vielen Organismen ist bekannt, daß sie - abhängig vom Salzgehalt des sie umgebenden Mediums - im Zellinneren osmotisch aktive Substanzen akkumulieren, die einerseits die Enzymsysteme bei Herabsetzung des Wasserpotentials (dem Wasserentzug durch die Osmose) zu schützen vermögen, andererseits aber auch einen osmotischen Gegendruck in der Zelle aufrechterhalten (WEGMANN, 1977). Darunter sind z.B. freie Aminosäuren wie Prolin, Alanin oder Glutamin zu finden, wie bei der Kröte *Bufo boreas*, einigen Invertebraten und Moluskken. Aber auch bei höheren Pflanzen und Algen werden Aminosäuren unter osmotischer Belastung angehäuft.

Eine andere Klasse der Osmotika sind die Polyole, die hauptsächlich von Algen und Hefepilzen (BROWN und SIMPSON, 1972) bei hoher osmotischer Belastung angehäuft werden. Häufige Vertreter dieser Stoffklasse sind Mannit, Galaktosylglycerid (Isofloridosid) und Glycerin. Eine Übersicht findet sich bei WEGMANN (1977).

UNIV. LEIDEN

Obwohl die Anpassung von Organismen an hohe und wechselnde Salinität der Umgebung und an Trockenheit ein augenfälliges Phänomen ist, ist über die biochemischen Regelmechanismen dieser Anpassung wenig bekannt. Die große Vielfalt der Organismen, die zu osmoregulatorischen Leistungen befähigt sind, läßt vermuten, daß es unterschiedliche Möglichkeiten der Regulation gibt. Den Schlüsselpunkt bildet die Antwort auf die Frage, wie ein Organismus die Veränderung eines physikalischen Parameters, des osmotischen Druckes, in eine Antwort auf der biochemischen Ebene, dem Stoffwechsel, umsetzen kann.

Bei der Alge *Poterioochromonas* wurde ein Membran- und Ca^{2+}-abhängiger Prozeß gefunden, der möglicherweise über Calmodulin zur proteolytischen Spaltung einer Enzym-Vorform führt. Aus dieser Proteolyse geht die aktive Isofloridosid-Synthase hervor, die die Synthese des Osmotikums Isofloridosid katalysiert (KAUSS, 1982, 1983).

Andere Primäreffekte der Osmoregulation sind derzeit nicht bekannt.

Die Untersuchung der Osmoregulation an Algen der Spezies *Dunaliella* war aus verschiedenen Gründen von Interesse. Erstens besitzen diese Algen einen sehr weiten Regulationsbereich (s.u.); dadurch werden auch die beobachtbaren Effekte sehr groß. Zweitens waren die großen Mengen Glycerin, die als Osmotikum gebildet werden, zeitweilig Gegenstand ökonomischer und technologischer Überlegungen (BEN-AMOTZ und AVRON, 1982).

Dunaliella tertiolecta ist eine einzellige, begeißelte Meeresalge. Im Gegensatz zu den meisten anderen Algen besitzt *Dunaliella* keine feste Zellwand; die Zelle ist nur von einer Zellmembran umgeben. Die Zellwand von *Dunaliella* ist semipermeabel, d.h. bei Veränderung der osmotischen Bedingungen im Außenmedium tritt Wasser aus der Zelle aus bzw. dringt in sie ein; je nachdem, ob der osmotische Wert des Außenmediums höher oder niedriger ist als der in der Algenzelle.

Trotz dieser Tatsache ist *Dunaliella* in erstaunlicher Weise an veränderbaren osmotischen Druck im Außenmedium angepaßt. Sie toleriert NaCl-Konzentrationen von $1,6 \cdot 10^{-2}$ M bis 5,6 M, was einer Salzzugabe zum Medium von 0,1 bis 33 % (w/v) entspricht. Der höchste tolerierte Wert liegt praktisch im Sättigungsbereich der NaCl-Lösung. (Im weiteren werden die Salzgehalte des Mediums der Einfachheit halber in Gewichts-% NaCl (MG = 58,44) im Nährmedium angegeben.)

Die Toleranz von *Dunaliella* ist nicht auf NaCl beschränkt, sie erstreckt sich vielmehr auch auf andere osmotisch wirksame Substanzen, z.B. Saccharose, Sorbit, 2-Desoxy-D-Glucose o.ä., soweit sie nicht für die Zelle toxisch sind. Polyäthylenglykol führt z.B. zum Verklumpen der Zellen (WEGMANN, unveröffentlicht). Es handelt sich also nicht um einen salzabhängigen Regelmechanismus, sondern um eine echte Osmoregulation.

Das Tolerieren solch unterschiedlicher Bedingungen ist für die Algenzelle nur deshalb möglich, weil sie in der Lage ist, den osmotischen Druck im Zellinneren dem des umgebenden Mediums anzupassen. Mikroskopisch kann beobachtet werden, daß die Algenzellen zunächst stark schrumpfen, wenn sie z.B. aus einem Medium mit 6 % NaCl auf 10 % NaCl umgesetzt werden. Die Flexibilität der Zellwand und das Fehlen einer Vakuole verhindern dabei plasmolytische Effekte. Nach 1-2 Stunden haben die Zellen jedoch praktisch ihre alte Form und Größe wiedererlangt.

Während dieser Anpassungsphase wird mit hohen Syntheseraten soviel Glycerin gebildet, daß damit in der Zelle ein dem Außenmedium adäquater osmotischer Druck aufgebaut werden kann (WEGMANN, 1971; BEN-AMOTZ & AVRON, 1973). Im osmotischen Gleichgewicht bleibt das produzierte Glycerin praktisch vollständig in der Zelle; nur ein kleiner Teil diffundiert ins Außenmedium (WEGMANN et al., 1980). In der Zelle kann das Glycerin als Osmotikum, als "compatible solute" (BOROWITZKA und BROWN, 1973) und als Stabilisator für Zellproteine etc. wirken.

Wird die Zelle osmotisch entlastet, bläht sie sich durch das Einströmen von Wasser zunächst auf. Die besonderen Eigenschaften der Zellmembran verhindern dabei weitgehend ein Zerplatzen (CURTAIN et al., 1983). Gleichzeitig diffundiert Glycerin durch die Zellwand ins Außenmedium (WEGMANN, 1983). Ein Teil des Glycerins wird zusätzlich im Zellinnern in den Stoffwechsel zurückgeführt und zur Stärkesynthese verwendet (WEGMANN, 1983).

Die Biochemie der Glycerinproduktion und damit der Osmoregulation bei *Dunaliella* ist seit der Entdeckung durch CRAIGIE und McLACHLAN (1964) Gegenstand verschiedenster Untersuchungen gewesen. Durch Einbauexperimente mit $^{14}CO_2$ konnte gezeigt werden, daß unter Photosynthese-Bedingungen die Vorstufen für das Glycerin aus dem CALVIN-Zyklus stammen (WEGMANN, 1969). Bei osmotischer Belastung erscheinen bis zu 80 % des fixierten $^{14}CO_2$ im Glycerin. Die Glycerinsynthese, die im osmotischen Gleichgewicht nur einen geringen Teil der Stoffwechselaktivität ausmacht, wird unter osmotischer Belastung zu einem Hauptweg im Zellmetabolismus (WEGMANN, 1971; BEN-AMOZ und AVRON, 1973; BOROWITZKA und BROWN, 1974).

Ist keine Photosynthese möglich, also im Dunkeln oder bei Zusatz von DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1,-dimethylharnstoff), das das Photosystem II blockiert, werden für die Glycerinsynthese Reservekohlenhydrate abgebaut (WEGMANN, 1981).

Für die Bildung und Wiederverwendung des Glycerins existierten zunächst zwei verschiedene Vorstellungen:

WEGMANN schlug 1969 einen Syntheseweg vor, der vom Dihydroxyaceton-Phosphat zum Glycerin führte. Die dazu notwendigen Enzyme, die Glycerinphosphat-Dehydrogenase und die Glycerinphosphat-Phosphatase, konnten in *Dunaliella*-Extrakten nachgewiesen werden (FRANK, 1972). Eine für die Rückführung des Glycerins in den Stoffwechsel notwendige Glycerin-Kinase-Aktivität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Von BEN-AMOTZ und AVRON wurde 1973 der Nachweis für die Existenz einer Dihydroxyaceton-Reduktase erbracht und eine Syn-

these über die Sequenz Dihydroxyacetonphosphat → Dihydroxyaceton → Glycerin vorgeschlagen. Die von LERNER und AVRON 1977 nachgewiesene Dihydroxyaceton-Kinase führte schließlich zur Postulation eines Glycerin-Zyklus durch WEGMANN (Diskussion zu AVRON, 1978).

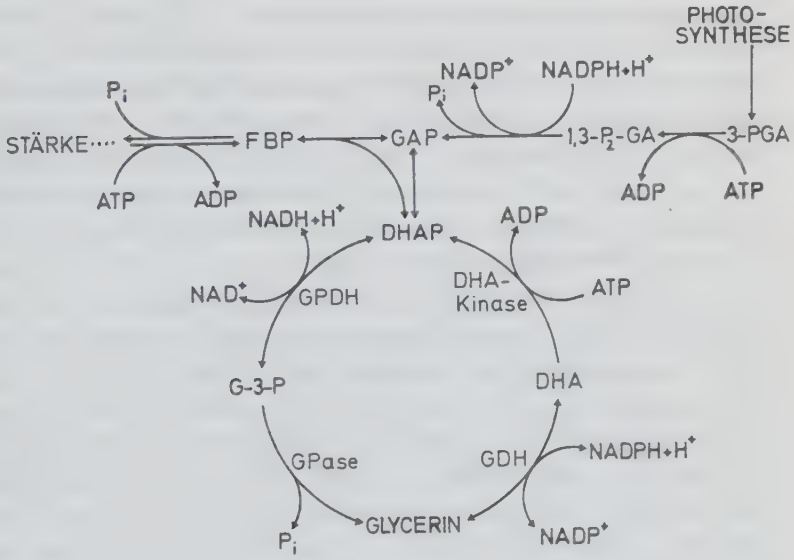


Abb. 1: Glycerin-Zyklus

Dieser Zyklus konnte auch die starke radioaktive Markierung des Glycerin-Pools in Algen erklären, die im sogenannten "osmotischen steady state", also ohne Veränderung des osmotischen Drucks im Außenmedium, mit $^{14}CO_2$ gefüttert wurden: durch den hohen K_M-Wert der Dihydroxyaceton-Reduktase (Glycerin-Dehydrogenase) für Glycerin von 1,5 M fließt, abhängig vom Glyceringehalt der Zelle, ein merklicher Teil des Glycerins in den Stoffwechsel zurück und wird durch markiertes Glycerin ersetzt. Tatsächlich ist die Markierungsrate des

Glycerins im osmotischen steady state umso höher, je höher der osmotische Druck im Außenmedium und infolgedessen auch die Glycerinkonzentration in der Zelle ist.

Für die Beantwortung der Frage nach dem Mechanismus der Osmoregulation in *Dunaliella* gibt es einige experimentelle Vorgaben:

Vergleiche zwischen Untersuchungen mit $^{14}CO_2$ und ^{14}C-markierter Reservestärke zeigen ein interessantes Phänomen: die Bildungsraten von markiertem Glycerin sind im Licht und im Dunkeln wie auch im Licht mit DCMU-blockierter Photosynthese gleich (WEGMANN und AVRON, in Vorber.). Dieser Befund läßt auf einen übergeordneten Regelmechanismus schließen. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß diese Regelstelle im Glycerin-Zyklus selbst liegt.

Bei einer Serie von Puls-Markierungsexperimenten, bei denen $^{14}CO_2$ in verschiedenen Zeitabständen nach osmotischer Belastung angeboten wurde, stieg die Markierungsrate des Glycerins direkt nach der osmotischen Belastung sofort auf hohe Werte an, fiel dann im weiteren Verlauf langsam ab und ging bis zum Erreichen des neuen steady state auf einen, gegenüber dem Wert vor der Belastung leicht erhöhten Wert zurück (WEGMANN, unveröffentlicht). Dieser zeitliche Verlauf der Markierungsrate belegt, daß tatsächlich die Bildungsgeschwindigkeit des Glycerins verändert wird, also die Synthesesequenz reguliert wird.

Durch die beiden irreversiblen Reaktionsschritte des Glycerin-Zyklus, der Glycerinphosphat-Phosphatase und der Dihydroxyaceton-Kinase ist dessen Laufrichtung vorgegeben. Die Synthese des Glycerins führt somit über die Sequenz Dihydroxyaceton-Phosphat → Glycerin-3-Phosphat → Glycerin.

Als eigentlicher Ort der Glycerinsynthese muß der Chloroplast angesehen werden. Dies geht zum einen aus der Arbeit von BROWN et al. (1982) hervor, in der nachgewiesen wird, daß die GPDH ein Chloroplastenenzym ist. Die Lokalisierung der GPase konnte allerdings in dieser Arbeit nicht eindeutig ermittelt werden.

Zum anderen zeigen Ergebnisse von WEGMANN und FRANK (pers. Mitteilung), daß auch isolierte Chloroplasten bei Salzbelastung Glycerin produzieren, wobei die Syntheseraten des Glycerin, bezogen auf Chlorophyll, praktisch gleich groß waren wie in ganzen Zellen. Der Bereich der Belastbarkeit mit Salz lag bei den Chloroplasten allerdings um eine Größenordnung niedriger als bei den intakten Algenzellen.

Wenn die Glycerin-3-phosphatase die Regelstelle des Glycerin-Zyklus darstellte, wäre zu fordern, daß die GPDH genügend hohe Aktivität besitzt, um während der Osmoregulation genügend G-3-P als Substrat für die Glycerinbildung zur Verfügung zu stellen. Im osmotischen steady state bei verringerter Glycerinsyntheserate würde die Phosphatase zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktionssequenz DHAP → G-3-P → Glycerin. Das thermodynamische Gleichgewicht der GPDH-Reaktion liegt weit auf der Seite der G-3-P-Bildung. Es wäre daher im osmotischen steady state eine Anhäufung von G-3-P vor der Phosphatase-Reaktion zu erwarten. In ^{14}C-Markierungsexperimenten (FRANK, 1972; FRANK und WEGMANN, 1974) konnte jedoch eine solche Anhäufung nicht festgestellt werden. BROWN et al. (1982) konnten zudem zeigen, daß die Aktivität der Glycerin-3-phosphatase in *Dunaliella*-Extrakten etwa 5 mal höher ist als die der GPDH, die damit zum geschwindigkeitsbestimmenden Enzym wird. Auf Grund dieser Befunde kann die Phosphatase als Regulationsstelle weitgehend ausgeschlossen werden.

Es muß somit angenommen werden, daß die GPDH das regulierte Enzym im Glycerinzyklus ist. Durch die hohe GPase-Aktivität wird die GPDH-Reaktion zudem quasi irreversibel, wie dies von BASSHAM und KRAUSE (1969) gefordert wird.

Um die Eigenschaften des Enzyms zu untersuchen und mögliche regulatorische Einflüsse von Metaboliten aufzuklären, war es notwendig, die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Dunaliella* zu isolieren.

Die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Säugetier- und Insektenmuskeln, die als BARANOWSKI-Enzym bekannt ist, ist ein

sehr stabiles Protein, das ohne weiteres kristallin erhalten werden kann (BARANOWSKI, 1949). Im Gegensatz dazu sind die pflanzlichen Enzyme offenbar generell wesentlich empfindlicher. Die Aktivität dieses Enzyms konnte - obwohl für die Lipid- und Fettsynthese notwendig - außer bei *Dunaliella* lange nicht nachgewiesen werden. Erst 1979 gelang es SANTORA et al., eine sn-Glycerin-3-Phosphat-NAD-oxidoreduktase in Spinatblättern nachzuweisen und zu isolieren. Allerdings ist auch dieses Enzym im Vergleich zum *Dunaliella*-Enzym relativ stabil und läßt sich über mehrere Stufen isolieren und anreichern.

Auf Grund der Instabilität des *Dunaliella*-Enzyms, insbesondere bei allen Konzentrierungsverfahren (WEINS, 1978), war es notwendig, zur Isolierung eine möglichst schnelle Methode mit wenigen Isolierungsschritten auszuarbeiten. Dabei war neben einer möglichst hohen Anreicherung eine hohe Volumenaktivität des gereinigten Enzyms ein wesentliches Kriterium für die Bewertung der Reinigungsmethode.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Dunaliella* zu isolieren und die Eigenschaften des Enzyms wie auch die Einflüsse möglicher Regulatoren zu untersuchen. Diese Kenntnisse sollen dazu beitragen, die Rolle der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase bei der osmoregulatorischen Glycerin-Synthese zu definieren und mögliche Steuerungsmechanismen aufzuklären.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

D,L-α-Glycerophosphat (Serva, Heidelberg; Sigma, München, Koch Light Laboratories)

AMP-Sepharose 6B; DEAE-Sephadex A-25; Sephadex G 25; Sephadex G 50; Cibacronblue Sepharose Cl 6B; Dextranblau 2000 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)

Coomassie brilliant blue G 250; Servablau G; DEAE Servacell; Tris; NADH, special grade for enzyme kinetics; BSA (Serva, Heidelberg)

L-α-Glycerophosphat, Dicyclohexylammoniumsalz; ATP, Dinatriumsalz; AMP, Dinatriumsalz; FBP, Trinatriumsalz; GPDH aus Kaninchenmuskel; Testkit Glycerin, Nr. 148270; β-NAD, Reinheitsgrad I und II (Boehringer, Mannheim)

Nucleinsäure II (Roth, Karlsruhe)

$Na_2{}^{14}CO_3$, 57,5 mCi/mMol (Amersham Buchler, Braunschweig)

Trifluoperazin (Röhm Pharma GmbH, Darmstadt)

EGTA (Ega-Chemie GmbH & Co. KG, Steinheim)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren analysenreine Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

2.2. Methoden

2.2.1. Kultur der Algen

Die Kultur der Algen (*Dunaliella tertiolecta*) erfolgte in Kulturröhren mit den Abmessungen 4 x 40 cm, in die zur Begasung von unten ein Gemisch von 98 % Preßluft / 2 % CO_2 (v/v)

eingeleitet wurde. Die Röhren standen in einem Lichtthermostaten, dessen Wasserbad auf 25°C eingestellt wurde. Die Beleuchtung erfolgte durch 6 Leuchtstoffröhren des Typs OSRAM-L 40 W/25-1 aus ca. 25 cm Entfernung.

Zusammensetzung des Nährmediums:

Salze	Einwaage (g/l)	Endkonzentration (mM)
NaCl	20-120	330-2000
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	10	44
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	1,5	10
KNO_3	1,0	10
KH_2PO_4	0,02	0,15

Zu 1 l dieser Lösung wurden jeweils 1 ml der folgenden Spurenelement-Stammlösungen zugegeben:

Salz	Einwaage/l	Konzentration im Nährmedium
NaFeEDTA	5,5 g	15 µM
H_3BO_3	11,4 g	185 µM
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	1,39 g	7 µM
$ZnCl_2$	1,11 g	0,8 µM
$Co(NO_3)_2 x 6 H_2O$	6 mg	0,02 µM
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,05 mg	0,2 µM

Zum Überimpfen wurden die Algen 5 min bei ca. 1500 x g (Varifuge S, Heraeus-Christ) abzentrifugiert, in frischem Nährmedium resuspendiert und einmal gewaschen. Nach dem 2. Zentrifugieren wurden die resuspendierten Algenzellen auf eine Algenröhre mit frischem Nährmedium überimpft. Die Zellzahl der frisch angesetzten Suspension lag bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

Für die Experimente wurden die Zellsuspensionen nach 3-4 Tagen in der logarithmischen Wachstumsphase abgeerntet.

2.2.2. Aufschlußmethoden

Für den Aufschluß der Algenzellen wurden folgende Puffer verwendet: 100 mM Phosphatpuffer (KPP), 100 bzw. 50 mM Trishydroxymethylaminomethan/HCl-Puffer (TRIS), 100 mM Triäthanolaminpuffer (TRAP), 100 mM Glycin/NaOH-Puffer.

Zum Schutz der Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase wurden den Puffern während des Zellaufschlusses und der nachfolgenden Reinigungsschritte 10 mM EDTA und 0,2 mM Dithioerythrit (DTE) zugesetzt. Die Puffer mit diesen Zusätzen werden im weiteren als Isolationspuffer bezeichnet. Beim Zellaufschluß wurde stets das Puffersystem des nachfolgenden Reinigungsschrittes eingesetzt.

2.2.2.1. Aufschluß im BÜHLER-Homogenator

Die Algensuspension wurde bei 1500 x g abzentrifugiert und zweimal mit Isolationspuffer gewaschen. Das Sediment wurde in wenig Isolationspuffer aufgenommen und resuspendiert. Das Homogenisationsgefäß wurde zu 2/3 mit Glasperlen gefüllt und die Algensuspension bis ca. 5 mm unter den Rand des Gefäßes eingefüllt. Anschließend wurde mit Puffer und Glasperlen bis zum Rand aufgefüllt. Das Gefäß wurde in den BÜHLER-Homogenator eingespannt und der Inhalt 30 min unter Wasserkühlung homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat auf eine Glasfritte G-1 gegeben und mit leichtem Unterdruck abgesaugt.

2.2.2.2. Aufschluß mit Glasperlen im Zentrifugenglas

250 ml Algensuspension wurden bei 1500 x g abzentrifugiert und zweimal mit Isolationspuffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden ins Zentrifugenglas zum Sediment soviel

Glasperlen gegeben, daß ein dicker Brei entsteht. Dann wurde fünfmal 30 sec. im Zentrifugenglas auf einem Whirlmix gemischt; mit Unterbrechungen von 1 min, während deren das Glas im Eisbad gekühlt wurde. Der Homogenat/Glasperlenbrei wurde auf einer Fritte G-1 abgesaugt und die zurückbleibenden Glasperlen mit 10 ml Isolationspuffer nachgespült.

2.2.2.3. Aufschluß durch Ultraschall-Behandlung

1 l Zellsuspension wurde in 250 ml Portionen bei 1500 x g abzentrifugiert, zweimal mit 10 ml Isolationspuffer gewaschen, in 10 ml Isolationspuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Suspensionen wurden unter Kühlung im Eiswasserbad mit einem BRANSON Sonic Power-Ultraschall-Gerät mit Mikrorüssel in 5 sec. Pulsen mit 30 sec. Pause homogenisiert. Zur Ermittlung der optimalen Pulszahl wurden verschiedene Proben 1-5 mal beschallt und die Enzymaktivitäten in den Rohextrakten bestimmt.

2.2.2.4. Gewinnung der Rohextrakte

Die Homogenate wurden im Kühlraum 30 min bei 65000 x g (RU-VE-KZ-30, Runne, Heidelberg) abzentrifugiert und der Überstand mit einer Spritze abgesaugt.

2.2.3. Chlorophyllbestimmung nach RÖBBELEN (1957)

1-5 ml Algensuspension wurden 3 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Aceton aufgenommen, 10 sec mit Ultraschall behandelt und die Zelltrümmer 3 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Die Bestimmung erfolgte photometrisch im Überstand.

Berechnung:

Chlorophyll a = $10,3 \times E_{663} - 0,918 \times E_{644}$

Chlorophyll b = $19,7 \times E_{644} - 3,87 \times E_{663}$

Hieraus berechnet sich die Konzentration in µg/ml Acetonlösung. Sie wird auf das eingesetzte Volumen Zellsuspension umgerechnet.

2.2.4. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

2.2.4.1. Herstellung der Färbelösung

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden in 50 ml 95 %-igem Ethanol aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 100 ml 85 %-ige Phosphorsäure (w/v) gegeben und die Lösung auf ein Volumen von 1 l mit H_2O dest. aufgefüllt. Bei der Verwendung von Servablau G wurden wegen des höheren Reinheitsgrades nur 50 mg eingewogen.

2.2.4.2. Durchführung der Bestimmung

Für verschiedene Bereiche der Proteinkonzentration wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Dadurch war gewährleistet, daß die Bestimmung im linearen Teil der Eichkurve erfolgte:

Im Bereich 10-100 µg Protein/ml: 100 µl Probe + 1 ml Reagens
" " 100-1000 µg Protein/ml: 10 µl Probe + 1 ml "
" " 1 mg - 5 mg Protein/ml: 10 µl Probe + 5 ml "

2.2.5. Aktivitätsbestimmung der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase

2.2.5.1. G-3-P Oxidation

500 µl Glycin/Hydrazin-Puffer (0,5/0,4 M) pH 9,2
100 µl Enzymlösung
20 µl NAD Endkonzentration 3,8 mM

Start der Reaktion mit
100 µl G-3-P Endkonzentration 0,1 mM

Die Messungen wurden bei 25°C bei 334 nm durchgeführt.

2.2.5.2. DHAP-Reduktion

500 µl 100 mM Malat/TRIS-Puffer pH 7,5
100 µl Enzymlösung
20 µl NADH Endkonzentration 1,5 mM

Start der Reaktion mit
100 µl DHAP Endkonzentration 0,7 mM

Die Messungen wurden bei 25°C bei 366 nm durchgeführt.

2.2.6. Phosphatbestimmung nach FISKE-SUBBAROW (1925)

2.2.6.1. Lösungen

1. 7,0 g $Na_2S_2O_5$ ad 100 ml
2. 5,0 g Ammoniummolybdat ad 100 ml 1 N H_2SO_4
3. 2,0 g Hydrochinon + 90 ml H_2O dest. + 0,2 ml H_2SO_4 conc mit H_2O dest. ad 100 ml
4. 43,2 g Na_2CO_3 + 6,0 g Na_2SO_3 ad 300 ml H_2O dest.

2.2.6.2. Durchführung der Bestimmung

1 ml Probelösung wurde mit jeweils 0,5 ml der Lösungen 1, 2 und 3 versetzt. Nach 5 min wurden 7 ml Lösung 4 zugegeben, die Mischung 15 min im Dunkeln stehen gelassen und anschließend die Extinktion bei 578 nm gemessen. Der Meßbereich reichte von 0,05 - 2 mM PO_4.

2.2.7. Stabilisierung der G-3-P Dehydrogenase

Eine Stabilisierung des Enzyms durch verschiedene Bedingungen bzw. Zusätze wurde untersucht.

2.2.7.1. Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen zum Rohextrakt

Nach Aufschluß der Algenzellen in TRIS-Isolationspuffer wurden zu jeweils 5 ml des Rohextrakts 5 ml TRIS-Isolationspuffer + 1 M Glycerin bzw. 1 M Sorbit zugegeben. Nach 0, 2, 4 und 22 Stunden wurde die Enzymaktivität im Rohextrakt und in den Proben mit Zusatz gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Proben im Kühlschrank bei ca. 6°C aufbewahrt.

2.2.7.2. Zusatz von Polyelektrolyten

2.2.7.2.1. BSA

Zum Eluat der AMP-Säule wurde BSA (100 µg/ml) zugegeben und die Enzymaktivität nach 24 h gemessen.

2.2.7.2.2. Nucleinsäure

Zum Rohextrakt in TRIS-Isolationspuffer wurde Nucleinsäure II von Roth in einer Konzentration von 1 mg/ml zugegeben und die Enzymaktivität nach 0 und 4 Stunden im Rohextrakt und in der Probe mit Zusatz gemessen.

2.2.7.3. Lichtschutz

2.2.7.3.1. Stabilitätskurve im Dunkeln

Rohextrakt-Aliquots wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und die Enzymaktivität nach 10, 34, 82 und 88 h bestimmt.

2.2.7.3.2. Hell-Dunkel-Vergleich in verschiedenen Puffern

1. Rohextrakt in 100 mM TRIS/10 mM EDTA pH 7,0 = (R)
2. 1,5 ml (R) + 0,5 ml 100 mM TRIS/10 mM EDTA/0,2 mM DTE/ 20 % Glycerin pH 7,0 = (P)
3. 1 ml (R) + 1 ml (P)
4. 0,5 ml (R) + 1,5 ml (P)
5. 1,5 ml (R) + 0,5 ml 100 mM KPP/10 mM EDTA/0,2 mM DTE pH 7,0
6. 1 ml (R) + 1 ml 100 mM KPP/10 mM EDTA/0,2 mM DTE pH 7,0
7. 2 ml (R) mit 15 % Glycerin

Von diesen Ansätzen wurden Aliquots jeweils hell und dunkel bei 4°C gelagert. Nach 20, 30 und 43 h wurde die Enzymaktivität bestimmt.

2.2.7.3.3. Belichtung der Enzymlösung bei verschiedenen Wellenlängen

An einem Zeiss-PMQ-2 Photometer mit Registriereinrichtung wurden die Spektren von Eluaten der DEAE-Sephadex-Säule (2.2.14.4.) aufgenommen. Mit einer Belichtungsapparatur der Fa. Schoeffel Instruments, Trappenkamp (Xenon-Bogenlampe: Osram XBO 450 W, Lampenhaus: LHC 151/2, Monochromator: High Intensity Grating Monochromator G.M. 250) wurden die Enzymlösungen anschließend 30 min mit monochromatischem Licht der Wellenlänge der gefundenen Absorptionsbanden belichtet. Eine Kontrollküvette wurde im gleichen Raum (Temperatur) während dieser Zeit dunkel gehalten. Anschließend wurden die Enzymaktivitäten verglichen.

2.2.8. Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose Cl-6B

Bindung und Elution der GPDH in *Dunaliella*-Rohextrakten wurden unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es wurden jeweils 10 ml Rohextrakt auf eine 1,2 x 5 cm Säule aufgetragen und nach Waschen mit dem 10-fachen Säulenvolumen eluiert.

Auftrags- und Waschpuffer	Elution
a) 100 mM KPP Isolationspuffer pH 6,8	100 mM TRIS Isolationspuffer pH 7,0
b) 100 mM KPP Isolationspuffer pH 6,8	100 mM KPP Isolationspuffer, linearer Gradient von pH 7-10
c) 100 mM KPP-Isolationspuffer pH 6,8	100 mM TRIS Isolationspuffer, linearer Gradient von pH 7-9
d) 100 mM TRAP Isolationspuffer pH 6,8	Waschpuffer

e) 10 mM TRIS-Puffer pH 6,8/ 5 % Glycerin/0,2 mM DTE — Waschpuffer pH 9,5

f) 10 mM TRIS-Puffer pH 6,8/ 0,5 % Glycerin/0,02 mM DTE — Waschpuffer

g) 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,0/50 mM DL-α-G-3-P, pH 7 — 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,0

2.2.9. Phosphatbestimmung an AMP-Sepharose

0,75 ml gepackte AMP-Sepharose wurden mit 0,75 ml H_2SO_4 conc versetzt und nach kräftigem Kochen mit NaOH neutralisiert - Endvolumen 5,5 ml. Im Überstand wurde die Phosphatkonzentration nach 2.2.6. bestimmt.

2.2.10. Messung der 5'-Nucleotidase im Rohextrakt nach HEPPEL und HILMOE (1955)

Testansatz:

100 µl 0,8 M Glycin/NaOH pH 8,5	Endkonzentration 0,08 M
100 µl 0,08 M $MgCl_2$	Endkonzentration 0,008 M
100 µl 24 mM AMP	Endkonzentration 2,4 mM
700 µl Rohextrakt	

Der Testansatz wurde nach 15 min bei 37°C mit TCA (Endkonzentration 5 %) gestoppt und der Überstand nach dem Zentrifugieren in die Phosphatbestimmung nach 2.2.6. eingesetzt. 1 U = 1 µMol Phosphat/h.

Zusätzlich wurde ein Reagentienleerwert ohne Rohextrakt inkubiert und ebenfalls mit TCA gestoppt.

Zur Bestimmung des Phosphats im Rohextrakt wurde eine entsprechende Probe direkt mit TCA gefällt und der Überstand nach Zentrifugieren in die Phosphatbestimmung eingesetzt.

2.2.11. Versuche zur Hemmung und Abtrennung der Nucleotidase im Rohextrakt

2.2.11.1. Hemmung durch Fluorid

Mit dem Rohextrakt wurden drei verschiedene Testansätze gemessen:

1. Normaltest nach 2.2.10.
2. Testansatz ohne $MgCl_2$
3. Testansatz + 100 mM NaF

2.2.11.2. Hemmung durch Fluorid, Silikat und Komplexbildner

Die Algen wurden in H_2O bidest. aufgeschlossen = Rohextrakt A. Zu einem Teil des Rohextrakts wurde EDTA bis zur Endkonzentration von 10 mM zugesetzt = Rohextrakt B.

Testansätze:

1. Normaltest nach 2.2.10. mit Rohextrakt A
2. Normaltest mit Rohextrakt B
3. Test mit Rohextrakt A ohne $MgCl_2$
4. Test mit Rohextrakt B ohne $MgCl_2$
5. Test mit Rohextrakt A + 100 mM NaF
6. Test mit Rohextrakt B + 100 mM NaF
7. Test mit Rohextrakt A + 100 mM Na_2SiO_3
8. Test mit Rohextrakt B + 100 mM Na_2SiO_3

2.2.11.3. Versuche zur Abtrennung der Nucleotidase aus dem Rohextrakt

Jeweils 5 ml Rohextrakt in 100 mM TRIS-Isolationspuffer wurden auf eine Sephadex G-150 bzw. Sephacryl S-200 Säule (1,2 x 80 cm) aufgetragen und mit 100 mM TRIS-Isolationspuf-

fer eluiert. Die Fließgeschwindigkeit war 30 cm/h ≙ 0,5 ml/min.

2.2.12. Phosphat-Gehalt von Algenzellen

2.2.12.1. Phosphat-Gehalte von Algen im osmotischen steady state

a) 250 ml Algensuspension aus 2 % NaCl-Medium wurden in 2 identische Aliquots aufgeteilt. Zum einen wurden 125 ml 2 % NaCl-Medium zugegeben, zum anderen das gleiche Volumen 6 % NaCl-Medium. Nach 15 min Kulturzeit in den Algenröhren wurden die Algen abzentrifugiert und 2 x mit NaCl-Lösung der entsprechenden Konzentration gewaschen. Die gesamte Waschprozedur dauerte ca. 1/2 h, da die Sedimente nach dem Zentrifugieren sehr vorsichtig resuspendiert werden mußten, um eine vorzeitige Lyse der Algenzellen zu vermeiden. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die sedimentierten Zellen (ca. 0,3 ml) in 0,3 ml H_2O resuspendiert und mit eiskalter TCA (Endkonzentration 10 %) im Eis gefällt. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung wurden die Lysate bei 1500 x g zentrifugiert. Aliquots der noch trüben Überstände wurden 1:2 mit H_2O verdünnt und über Celluloseacetatfilter mit einer Filterspritze klarfiltriert. Diese Lösungen wurden in die Phosphatbestimmung nach 2.2.6. eingesetzt.

b) Jeweils 300 ml Algensuspension aus 2 %, 6 % und 10 % NaCl-Medium wurden abzentrifugiert und auf frisches Medium der gleichen Konzentration überführt. Aus einem Aliquot wurde das "wet packed volume" in einem graduierten Hämatokritröhrchen nach 5 min Zentrifugation bei 1500 x g bestimmt. Die Suspensionen wurden abzentrifugiert, mit je 4 ml H_2O aufgeschlämmt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Lysate wurden 10 min bei 10000 x g abzentrifugiert und die Phosphatkonzentration in den Überständen bestimmt.

2.2.12.2. Phosphat-Gehalt von Algen während der Osmoregulation

a) 20 ml Algen aus 6 % NaCl-Medium wurden abzentrifugiert, kurz mit wenig 6 % NaCl-Medium gewaschen, in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt und nochmals zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit je 2 ml 6 %- bzw. 10 %-NaCl-Medium aufgeschlämmt und 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen abzentrifugiert und die Überstände gesammelt: 6 Ü bzw. 10 Ü.
Die beiden Algenpellets (ca. 100 µl) wurden in 2 ml H_2O aufgeschlämmt und wie unter 2.2.12.1.b) lysiert und zentrifugiert. Die Überstände 6A und 10A wurden in die Phosphatbestimmung eingesetzt.

b) 300 ml Algensuspension aus 6 % NaCl-Medium wurden in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt, abzentrifugiert und die Überstände gesammelt: 6 Ü.
Die beiden Pellets (0,8 ml) wurden mit 3 ml 6 % bzw. 10 % NaCl-Medium aufgeschlämmt, 10 min inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Überstände 6 $Ü_1$ und 10 $Ü_1$ wurden gesammelt. Die Pellets wurden in je 4 ml H_2O aufgeschlämmt und wie unter 2.2.12.1.b) lysiert und zentrifugiert. Die Überstände 6A und 10A wurden in die Phosphatbestimmung eingesetzt. Zusätzlich zu diesen Proben wurde auch der Phosphatgehalt der Nährlösung bestimmt.

2.2.13. Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen

Zur Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen wurden 6 ml einer Algensuspension aus 6 % NaCl-Medium mit 4 ml 18 %, 15 %, 12,5 %, 9,5 % und 6 % NaCl-Medium versetzt. Es ergibt sich dadurch eine Reihe von 10 %, 8,9 %, 8,16 %, 7,16 % und 6 %-Medium. Sofort nach Zugabe und Mischen wurde aus 1 ml dieser Suspensionen das "wet packed volume" wie unter 2.2.12.1.b) bestimmt. Wird das relative Volumen (wet

packed volume in % des wet packed volume der unbelasteten Algen) gegen 1/Salzkonzentration aufgetragen, erhält man bei Extrapolation auf Salzkonzentration ∞ das osmotisch nicht komprimierbare Volumen der Algenzelle in % des Gesamtvolumens; die Differenz zu 100 % ergibt das relative osmotische Volumen, das am Wasseraustausch bei osmotischer Belastung teilnimmt.

2.2.14. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex

2.2.14.1. Vorversuche

Es wurden 5 Reagenzgläser mit je 2,5 ml DEAE-Servacel in 100 mM Tris-Isolationspuffer der pH-Werte 7, 7,5, 8, 8,5 und 9 vorbereitet. Dann wurden jeweils 1 ml Rohextrakt im entsprechenden Puffer auf den Ionenaustauscher aufgetragen und die Aktivität der GPDH im Überstand bestimmt.

Ein entsprechender Versuch wurde mit DEAE-Sephadex A-25 durchgeführt.

2.2.14.2. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25

250 ml Algensuspension wurde nach dem Zentrifugieren 2 x mit je 10 ml 50 mM TRIS-Isolationspuffer pH 8,5 gewaschen und anschließend homogenisiert. Der Rohextrakt (5 ml) wurde auf eine DEAE-Sephadex A-25 Säule (1,5 x 20 cm) aufgetragen, mit 1,3 Säulenvol. 50 mM TRIS-Isolationspuffer gewaschen und mit 400 ml eines linearen KCl-Gradienten (0-1 M KCl in 50 mM TRIS-Isolationspuffer) eluiert. Die Flußrate betrug 10 cm/h.

In einem weiteren Versuch wurde der Rohextrakt in 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5 auf die Säule aufgetragen und

nach dem Waschen mit 1,3 Säulenvolumina mit 400 ml eines linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in 100 mM TRIS-Isolationspuffer eluiert.

2.2.14.3. Messung der Desorptionskonzentration von NaCl

Bei einer weiteren Gradientenelution mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,25 mM NaCl in 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5 wurde die Leitfähigkeit des Eluats in der Umgebung des Enzympeaks gemessen. Die Leitfähigkeit wurde stets in 1:10 verdünnten Proben gemessen.

2.2.14.4. Stufenelution der DEAE-Sephadex A-25 Säule

Zur Verringerung der Verweildauer auf der Säule wurde die GPDH mit einem Stufengradienten eluiert. Die Säule wurde mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5 + 13 mS/cm ≙ 38 mM NaCl äquilibriert und der Rohextrakt mit NaCl auf die entsprechende Leitfähigkeit eingestellt. Nach dem Auftragen und Waschen wurde mit einer Salzstufe (100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5 + 21 mS/cm NaCl) eluiert.

2.2.15. Einfluß von G-3-P auf die Aktivität der GPDH

Das Eluat der DEAE-Sephadex A-25 Säule wurde mit Glycerin-3-Phosphat (Endkonzentration 100 mM) versetzt und die Aktivität der GPDH nach 1/2 h und nach 3 1/2 h gemessen.

2.2.16. Chromatographie an Hydroxyapatit

2.2.16.1. Herstellung von Hydroxyapatit nach BERNARDI (1971)

a) 2 l 0,5 M $CaCl_2$ bzw. Na_2HPO_4 werden mit einer Flußrate von 250 ml/h unter Rühren in einem 5 l-Becherglas gemischt, so daß der Niederschlag gerade nicht ausfällt. Anschließend läßt man das gefällte Calciumphosphat ($CaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$) sedimentieren und wäscht dann den Niederschlag zweimal mit je 4 l H_2O dest.

b) a wird in 4 l H_2O dest. suspendiert. Unter Rühren werden 100 ml 40 % NaOH (w/w) zugegeben. Anschließend wird die Mischung zum Sieden erhitzt (ca. 50 min) und 1 Stunde unter Rühren gekocht. Nach Sedimentation wird der Überstand abgesaugt. Der Niederschlag wird in 4 l H_2O dest. suspendiert und der Überstand wird abgesaugt, wenn sich ein etwa 2 cm hoher Niederschlag abgesetzt hat (Entfernung der Fines). Dann wird noch zweimal gewaschen; hierbei können evtl. 2 Präparationen vereinigt werden. Der Niederschlag wird in 4 l 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 suspendiert, ca. 5 min gekocht, sedimentiert und anschließend nochmals in frischem 10 mM bzw. 1 mM NaP-Puffer 15 min gekocht. Die Suspension muß beim Kochen langsam gerührt werden.

2.2.16.2. Vorversuch

36 ml Rohextrakt in Glycin-Isolationspuffer pH 8,2 wurden auf eine Hydroxyapatitsäule (2,6 x 15 cm) aufgetragen. Anschließend wurde versucht, die GPDH mit 100 mM NaCl von der Säule zu eluieren.

2.2.16.3. Elution mit Glycerin-3-Phosphat

Hydroxyapatit wurde 1/2 h mit 0,1 N NaOH gekocht, anschließend mit KPP pH 7,0 gewaschen, in eine Säule (5 x 15 cm) gefüllt und mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,2 äquilibriert. 34 ml Rohextrakt in Glycin-Isolationspuffer pH 8,2 wurden mit einer Flußrate von 9 cm/h auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit 10 Säulenvolumina wurde mit Glycin-Isolationspuffer pH 8,2/150 mM G-3-P eluiert.

2.2.16.4. Gradientenelution mit G-3-P

Nach Vorbereitung der Säule, Auftragen des Rohextrakts und Waschen wie bei 2.2.16.2. wurde mit 300 ml eines linearen Gradienten von 0-200 mM G-3-P in Glycin-Isolationspuffer pH 8,2 eluiert.

2.2.17. Konzentrierung des Enzyms mit trockenem Sephadex

a) 14,5 ml Enzymlösung aus den Säuleneluaten wurden mit 4 g trockenem Sephadex G-25 coarse gemischt und nach 10 min in einem Zentrifugeneinsatz mit Glasfritte 5 min bei 1500 x g abzentrifugiert.

b) 30 ml Enzymlösung wurden mit 5 g Sephadex G-50 gemischt und nach 10 min wie unter a) abzentrifugiert.

2.2.18. Affinitätschromatographie an Cibacron blue Sepharose Cl 6 B (Blausepharose)

2.2.18.1. Vorversuche zur Bindung von GPDH aus dem Rohextrakt an Blau-Sepharose

1 ml Rohextrakt in 20 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5 wurde im Batch-Verfahren auf 1 ml Blausepharose (mit dem gleichen Puffer äquilibriert) aufgetragen. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Gel mit 50 mM und 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5, anschließend mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,5 + 1 mM, 10 mM bzw. 15 mM NAD äquilibriert. Die jeweiligen Überstände wurden abgesaugt und die Enzymaktivität nach 2.2.5.1. bestimmt.

2.2.18.2. Enzymtest mit Dextranblau 2000

Die Enzymaktivität im Rohextrakt wurde nach 2.2.5.1. bestimmt. In einem weiteren Testansatz wurde nach Starten der Reaktion mit G-3-P 100 µl Dextranblaulösung (eine Spatelspitze in 2 ml 20 mM TRIS-Isolationspuffer) gegeben. Anschließend wurde durch Zugabe von 20 µl NAD-Stammlösung die NAD-Konzentration im Test auf 7,6 mM erhöht. In einem weiteren Testansatz wurden 100 µl Rohextrakt mit 100 µl Dextranblaulösung gemischt und diese Mischung im Test eingesetzt. Auch in diesem Versuch wurde die NAD-Konzentration nach dem Starten der Reaktion mit G-3-P auf 7,6 mM erhöht.

2.2.18.3. Chromatographie von Eluaten der Hydroxyapatitsäule an Blauesepharose

2.2.18.3.1. Batch-Versuch

2 ml des Eluats der Hydroxyapatitsäule nach 2.2.16.2. wurden im Eisbad in einem Reagenzglas auf 0,5 ml gepackte Blausepharose aufgetragen und die Aktivität der GPDH im Überstand bestimmt. Das Gel wurde 2 x mit je 2 ml Puffer gewaschen. Anschließend wurden 2 ml 0,06 mM bzw. 0,4 mM NAD in Puffer zugegeben und die freigesetzte Aktivität im Überstand bestimmt.

2.2.18.3.2. Chromatographie mit 150 mM G-3-P

Die aktiven Fraktionen einer Hydroxyapatitelution nach 2.2.16.2. (80 ml) wurden auf eine Blausepharosesäule (2,6 x 6 cm) aufgetragen, mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,2/150 mM G-3-P gewaschen und anschließend mit dem gleichen Puffer + 1 mM NAD eluiert. In einem weiteren Versuch wurden zur Elution 20 mM NAD zugesetzt.

2.2.18.3.3. Chromatographie ohne G-3-P

Nach dem Auftragen des Enzyms und Waschen wie unter 2.2.18.3.1. wurde mit 10 ml 100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,2 zwischengewaschen, um das Glycerin-3-Phosphat zu entfernen, und anschließend mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,2/5 mM NAD eluiert.

2.2.18.3.4. Unspezifische Desorption von der Blausepharose

Bei weiteren Elutionsversuchen von der Blausepharosesäule wurden die folgenden Elutionspuffer eingesetzt:

100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,2/150 mM G-3-P/0,2 M NaCl
" " " / " " /0,5 M NaCl
" " " / " " /5 % Ethylenglykol

2.2.19. Affinitätschromatographie an Blausepharose aus dem Rohextrakt

2.2.19.1. Optimierungsversuche

40 ml Rohextrakt aus ca. 1 l Algensuspension wurden auf eine Blausepharosesäule (2,6 x 4 cm) aufgetragen, mit 200 ml Puffer gewaschen und anschließend eluiert. Zur Optimierung wurden Auftrags-(Isolations-), Wasch- und Elutionspuffer variiert. Nach der Elution wurde das Gel mit 6 M Harnstoff in H_2O regeneriert und wieder mit Startpuffer äquilibriert.

Startpuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,5/ 150 mM G-3-P	Startpuffer	Startpuffer/ 1 mM NAD
"	100 mM Glycin-Isol.puffer pH 8,5	Waschpuffer/ 1 mM NAD
"	Startpuffer	Startpuffer/ 10 mM NAD
"	Startpuffer	Startpuffer/0,2 M NaCl, gefolgt von 1 mM NAD

"	Startpuffer	Startpuffer/ 0,5 M NaCl
"	Startpuffer	Startpuffer/ 5 % PEG
"	Startpuffer	Startpuffer 5 mM NAD/1 mM ADP
100 mM Glycin-Isolationspuffer pH 8,5/ 150 mM G-3-P/5 % Glycerin	Startpuffer	Startpuffer ohne Glycerin/5 mM NAD
100 mM Glycin-Isol. puffer pH 8,5/ 200 mM G-3-P	Startpuffer	Startpuffer/ 5 mM NAD
"	Startpuffer	Startpuffer/ 10 mM NAD
100 mM TRIS-Isol. puffer pH 7,8	Startpuffer/ 150 mM G-3-P	Waschpuffer/ 1 mM NAD
100 mM TRIS-Isol. puffer pH 7,8/ 250 mM G-3-P	Startpuffer	Startpuffer/ 5 mM NAD
"	Startpuffer	Startpuffer/ 1 mM NAD
100 mM TRIS-Isol. puffer pH 8,2/ 200 mM G-3-P	Startpuffer	Startpuffer/ 3 mM NAD
50 mM TRIS-Isol. puffer pH 8,2/ 200 mM G-3-P	Startpuffer	Startpuffer/ 3 mM NAD

2.2.19.1. Optimierte Reinigung der GPDH an Blausepharose

40 ml Rohextrakt in 50 mM TRIS-Isolationspuffer pH 8,2/ 200 mM DL-α-Glycerin-3-Phosphat wurden auf eine Blausepharosesäule (2,6 x 4 cm) aufgetragen, mit 200 ml des Auftragspuffers gewaschen und anschließend mit Auftragspuffer/3 mM NAD eluiert. Die Flußrate betrug 10 cm/h. Die aufgetragene Menge des Rohextrakts entspricht dabei etwa der 4-fachen Säulenkapazität.

2.2.20. Entfernung von Substrat und Coenzym aus den Eluaten der Blausepharosesäule

2.2.20.1. Entfernung von G-3-P mit DEAE-Sephadex

Die Eluate verschiedener Blausepharosesäulen nach 2.2.19.2. wurden zur Entfernung des G-3-P mit DEAE-Sephadex A-25 behandelt. Dazu wurde der Ionenaustauscher mit Auftragspuffer ohne Glycerinphosphat äquilibriert. Im Zentrifugenglas wurden 5, 7,5 bzw. 10 ml Gel gepackt und mit jeweils 5 ml Eluat aus der Blausepharosesäule gemischt. Nach der Sedimentation des Gels wurde die Entfernung von G-3-P aus dem Überstand mit käuflicher GPDH aus Kaninchenmuskel gemessen. Zusätzlich wurde die Aktivität des *Dunaliella*-Enzyms im Überstand gemessen.

2.2.20.2. Entfernung von G-3-P und NAD mit Sephadex G-50

Die enzymhaltigen Fraktionen der Blausepharoseelution nach 2.2.19.2. wurden vereinigt und in 2 ml Portionen auf eine Sephadex G-50 Säule (2,6 x 4 cm) aufgetragen. Anschließend wurde die GPDH mit 50 mM TRIS-Isolationspuffer pH 8,2 von der Säule eluiert. Die Flußrate betrug 5 cm/h.

2.2.21. Bestimmung der kinetischen Konstanten der GPDH

Die substrat- und coenzymfreien aktiven Fraktionen der G-50 Säule wurden so rasch wie möglich für die Enzymkinetiken verwendet, um eine Inaktivierung des Enzyms zu vermeiden.

2.2.21.1. Oxidation von Glycerin-3-Phosphat

Die Oxidation von Glycerin-3-Phosphat wurde in 0,5 M Glycin/ 0,4 M Hydrazin-Puffer pH 9,2 gemessen.

Testansatz	Konzentration im Test
500 µl Puffer	---
100 µl G-3-P	0,06 - 2 mM
100 µl Enzym	1 µg Protein
Start der Reaktion mit	
100 µl NAD	0,5 - 4 mM

Die Testbedingungen waren wie bei 2.2.5.1. beschrieben.

2.2.21.2. Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat

Die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat wurde in 100 mM Malat/TRIS-Puffer pH 7,5 gemessen.

Testansatz	Konzentration im Test
500 µl Puffer	---
100 µl DHAP	0,15 - 3 mM
100 µl Enzym	1 µg Protein
Start der Reaktion mit	
100 µl NADH	0,04 - 6 mM

2.2.22. Hemmkinetiken

Die Inhibitortests wurden in Richtung der DHAP-Reduktion in 100 mM Malat/TRIS-Puffer pH 7,5 durchgeführt.

Testschema	Konzentration im Test
500 µl Puffer	---
100 µl DHAP	0,05 - 0,5 mM
100 µl Inhibitor	
100 µl Enzym	1 µg Protein
Start der Reaktion mit	
100 µl NADH	0,05 - 0,5 mM

Als Inhibitoren wurden die folgenden Substanzen eingesetzt:

ATP	Endkonzentration im Test von	0,25 - 1 mM
AMP	"	9 - 27 mM
P_i	"	2 - 9 mM
FBP	"	1 - 10 mM

Die Inhibition durch P_i wurde auch in Richtung der G-3-P Oxidation gemessen:

Testschema	Konzentration im Test
500 µl Puffer nach 2.2.5.1.	
100 µl G-3-P	0,05 - 0,5 mM
100 µl P_i	0,31 - 0,62 mM
100 µl Enzym	1 µg Protein
Start der Reaktion mit	
20 µl NAD	3,8 mM

2.2.23. Untersuchung der pH-Abhängigkeit und Salzabhängigkeit der Enzymaktivität

2.2.23.1. pH-Abhängigkeit der G-3-P Oxidation

Die Enzymaktivität wurde nach 2.2.5.1. gemessen; 100 µl Enzymlösung enthielten 1 µg Protein. Zur Einstellung niedriger pH-Werte wurde der Testpuffer mit HCl titriert; höhere pH-Werte wurden durch Zusatz von Hydrazin eingestellt.

2.2.23.2. pH-Abhängigkeit der DHAP-Reduktion in verschiedenen Puffersystemen

Die Enzymaktivität wurde nach 2.2.5.2. gemessen; 100 µl Enzymlösung enthielten 1 µg Protein. Die pH-Abhängigkeit wurde in verschiedenen Puffersystemen untersucht:
100 mM TRIS/HCl; 100 mM HCl/TRIS
100 mM TRIS/Acetat; 100 mM Acetat/TRIS
100 mM TRIS/Malat; 100 mM Malat/TRIS

Die angegebene Konzentration bezieht sich dabei jeweils auf die erstgenannte Pufferkomponente; die Konzentration der zweiten Komponente variiert mit dem pH-Wert.

2.2.23.3. pH-Abhängigkeit der DHAP-Reduktion bei verschiedenen Pufferkonzentrationen

Die Enzymaktivität wurde nach 2.2.5.2. in 50 mM, 100 mM, 200 mM und 400 mM Malat/TRIS-Puffer im pH-Bereich zwischen 6 und 8,5 gemessen. Die Messungen wurden mit einem über Sephadex G-50 entsalzten Rohextrakt durchgeführt.

2.2.23.4. Einfluß der Salzkonzentration auf die Aktivität

Die Enzymaktivität wurde nach 2.2.5.2. in 100 mM TRIS/HCl Puffer pH 6,8 gemessen; 100 µl Enzymlösung enthielten 1 µg Protein. Der Puffer enthielt als Zusatz 10 mM, 100 mM, 200 mM oder 300 mM KCl. Für die Untersuchung des Effekts unterschiedlicher Ionen wurden dem Puffer NaCl, KNO_3 oder $NaNO_3$ in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt.

2.2.23.5. Einfluß verschiedener Puffersysteme und -konzentrationen

Die Enzymaktivität wurde nach 2.2.5.2. in den folgenden Puffersystemen gemessen:
50 mM, 100 mM und 200 mM TRIS/HCl pH 6,8
50 mM und 100 mM TRAP/HCl pH 6,8
50 mM und 100 mM TRIS/SO_4 pH 6,8
50 mM, 100 mM und 200 mM Malat/KOH pH 6,8
100 µl Enzymlösung enthielten 1 µg Protein.

2.2.23.6. Einfluß verschiedener Dicarbonsäuren

Die Enzymaktivität wurde nach 2.2.5.2. in den folgenden Puffersystemen gemessen:
40 mM und 200 mM Malat/KOH pH 6,8
40 mM und 200 mM Succinat/KOH pH 6,8
40 mM und 200 mM Aspartat/KOH pH 6,8
40 mM und 200 mM Glutamat/KOH pH 6,8
100 µl Enzymlösung enthielten 1 µg Protein.

2.2.23.7. Einfluß von Mannit auf die Aktivität der GPDH

Der Einfluß nicht ionischer, osmotisch aktiver Substanzen auf die Enzymaktivität wurde durch Zusatz von Mannit überprüft. Hierzu wurde die GPDH-Aktivität in einem über Sephadex G-50 entsalzten Rohextrakt in verschiedenen Testansätzen nach 2.2.5.2. gemessen; als Testpuffer wurde 50 mM Malat/TRIS Puffer pH 7,5 verwendet.

Testansätze:

a) 500 µl Puffer
   20 µl Enzym
   20 µl NADH
   100 µl H_2O bidest
   100 µl DHAP

b) 600 µl Puffer
   20 µl Enzym
   20 µl NADH
   100 µl DHAP

c) 500 µl Puffer
   20 µl Enzym
   20 µl NADH
   100 µl 1 M Mannit
   100 µl DHAP

2.2.24. Einfluß von Trifluoperazin und EGTA auf die Glycerinsynthese in *Dunaliella*

Als Ausgangskultur wurde eine *Dunaliella*-Kultur in 2 % NaCl-Medium verwendet.

Versuchsansätze:

a) Kontrolle: 10 ml Algensuspension wurden bei Versuchsbeginn 1:1 mit 2 % Medium gemischt.

b) Trifluoperazin: 10 ml Algensuspension wurden bei Versuchsbeginn 1:1 mit einer Trifluoperazin-Lösung (1 mg/ml in 2 % Medium) gemischt. Die Endkonzentration in der Suspension betrug 10^{-4} M/l.

c) EGTA 10^{-3}: 10 ml Algensuspension wurden bei Versuchsbeginn 1:1 mit einer EGTA-Lösung (8 mg/ml in 2 % Medium, mit NaOH auf pH 6 titriert) gemischt. Die Endkonzentration in der Suspension betrug 10^{-3} M/l.

d) EGTA 10^{-2}: die Algensuspension wurde wie unter c) behandelt, die Endkonzentration betrug jedoch 10^{-2} M/l.

Die 20-ml-Ansätze wurden in Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur mit einer Attralux-Lampe belichtet, wobei zur Vermeidung zu starker Erwärmung eine wasserdurchströmte Glasküvette dazwischengebracht wurde.

Nach 30 min. wurden 5 ml entnommen und 15 ml 10 % Medium zur osmotischen Belastung, bei b)-d) mit den entsprechenden Zusätzen, zugesetzt. Nach 20 und 60 min. wurden jeweils 20 ml Probe entnommen.

Die Proben wurden sofort nach Entnahme mit 35 ml siedendem Ethanol extrahiert, der abzentrifugierte Rückstand mit 20 ml H_2O nachextrahiert. Die Extrakte wurden zur Trockne einrotiert und in 1 ml H_2O aufgenommen. Der Glyceringehalt der Proben wurde enzymatisch nach Boehringer Test Nr. 148270 bestimmt.

2.2.25. Einfluß von Trifluoperazin auf die $^{14}CO_2$-Fixierung unter osmotischer Belastung

Eine Algensuspension mit 10^{-4} M Trifluoperazin und eine Kontrollsuspension wurden wie unter 2.2.24. beschrieben angesetzt. Beleuchtung und osmotische Belastung wurden wie in 2.2.24. durchgeführt. 5 min nach dem osmotischen Sprung wurden 20 µCi $Na_2{}^{14}CO_3$ zugegeben. Nach 10 min wurden die Ansätze wie in 2.2.24. aufgearbeitet. Ein Aliquot der wässrigen

Lösungen wurde in ein Szintillationsfläschchen pipettiert, zur Vertreibung des restlichen anorganischen Carbonats mit einem Tropfen Ameisensäure versetzt und im N_2-Strom eingetrocknet. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Die Fixierungsrate wurde auf Chlorophyll (aus der Ausgangskultur bestimmt) bezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Aufschlußmethoden

3.1.1. Glasperlenhomogenisation in verschiedenen Puffern

100 ml Aliquots einer Algenkultur aus 6 % NaCl-Medium wurden abzentrifugiert und in verschiedenen Puffern nach 2.2.2.2. homogenisiert. Die Unterschiede in der Aktivität der GPDH und im Chlorophyll a Gehalt der Rohextrakte sind in Tabelle 1 zusammengestellt:

Tabelle 1: Aktivität der GPDH und Chlorophyll-Gehalt im Rohextrakt bei der Glasperlenhomogenisation in verschiedenen Puffern

Puffer	U/ml	µg Chl a/ml	U/µg Chl a
100 mM KPP pH 7,5	0,07	6,62	0,011
100 mM TRIS pH 7,5	0,29	10,36	0,028
100 mM TRAP pH 7,5	0,31	10,29	0,030

3.1.2. Ultraschallaufschluß

Tabelle 2 zeigt die Abhängigkeit der GPDH-Aktivität im Rohextrakt in Abhängigkeit von der Zahl der Ultraschallpulse. Die Aktivität steigt bis zum 3. Puls an und fällt bei einer weiteren Erhöhung der Pulszahl wieder ab. Auch die Grünfärbung des Rohextrakts steigt bis zum 3. Puls an. Dies läßt darauf schließen, daß in zunehmendem Maß auch die Chloroplasten aufgeschlossen werden. Im Vergleich zu anderen Auf-

schlußmethoden konnten durch Ultraschallaufschluß die höchsten Gesamtaktivitäten der GPDH im Rohextrakt erhalten werden.

Tabelle 2: Abhängigkeit der GPDH-Aktivität im Rohextrakt von der Zahl der Ultraschallpulse (jeweils 5 sec Puls, 30 sec Pause)

Anzahl der Pulse	1	2	3	4	5
U/ml	0,11	0,18	0,23	0,19	0,14

3.2. Stabilisierung der GPDH

3.2.1. Stabilisierung durch Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen zum Rohextrakt

Die Ergebnisse des Versuchs 2.2.7.1. sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Einfluß osmotisch aktiver Substanzen auf die GPDH-Aktivität im Rohextrakt

Zeit (h)	Rohextrakt	+ 1 M Glycerin	+ 1 M Sorbit
0	0,28 U/ml	0,28 U/ml	0,285 U/ml
2,4	0,27 U/ml	0,27 U/ml	0,26 U/ml
22	0,06 U/ml	0,069 U/ml	0,063 U/ml

Die Werte der Rohextrakte mit Glycerin bzw. Sorbit sind für die Verdünnung durch die Zusätze korrigiert. Durch Sorbit kann nur eine geringfügige Stabilisierung des Enzyms gegenüber der Kontrolle erreicht werden, der Effekt des Glycerins ist etwas größer. Die Restaktivität betrug allerdings nach 22 h nur noch zwischen 21 % für die Kontrolle und 25 % für die Probe mit Glycerinzusatz.

3.2.2. Stabilisierung durch Zusatz von Polyelektrolyten

Ein Zusatz von Nucleinsäuren zum Rohextrakt (2.2.7.2.2.) brachte ebenfalls keine Verbesserung der Enzymstabilität.

In einem weiteren Versuch wurden dem Eluat der AMP-Säule, in dem eine besonders rasche Abnehme der GPDH-Aktivität mit der Zeit beobachtet wurde, 500 µg Rinderserumalbumin/ml zugesetzt. Mit diesem Zusatz konnte die Enzymaktivität über 24 h konstant gehalten werden und eine Reaktivierung der Enzymaktivität in 2 weiteren Fraktionen im Anschluß an den zuvor gemessenen Enzympeak erreicht werden. Da der Zusatz von Protein jedoch die Kapazität weiterer Reinigungsverfahren belastet und außerdem die Berechnung der Enzymreinigung wesentlich erschwert hätte (bei einer nachfolgenden Chromatographie an Sephadex G-50 wurde Rinderserumalbumin vor dem Enzym eluiert), da Stabilisierung durch Rinderserumalbumin und Abtrennung von weiterem Fremdprotein praktisch nicht zu quantifizieren waren, konnte dieses Verfahren nicht zur Stabilisierung des Enzyms während der Reinigung verwendet werden.

3.2.3. Stabilisierung durch Lichtschutz

3.2.3.1. Stabilitätskurve im Dunkeln

Abbildung 2 zeigt die Abnahme der Enzymaktivität im Rohextrakt mit der Zeit, wenn der Rohextrakt lichtgeschützt im Kühlraum gelagert wird. Im Unterschied zu der von WEINS (1978) erhaltenen Stabilitätskurve, bei der die Enzymaktivität am Anfang rasch abfällt, bleibt im vorliegenden Versuch die Aktivität zunächst weitgehend konstant und fällt dann langsam ab.

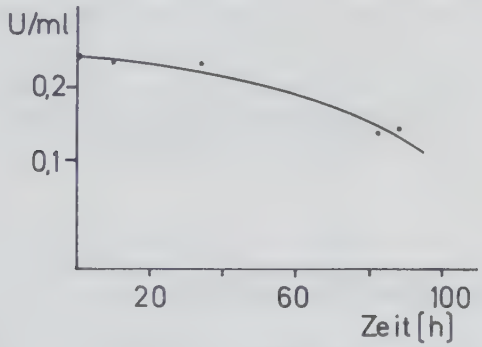


Abb. 2: Stabilität der GPDH im Rohextrakt unter Lichtschutz

3.2.3.2. Hell-Dunkel-Vergleich der GPDH-Aktivität in verschiedenen Puffern

Die größere Stabilität der GPDH im Dunkeln (Abbildung 2) und die Beobachtung, daß die Enzymaktivität beim Stehen im Eis während der Enzymtests stärker abnahm als über Nacht im Dunkeln, legte die Vermutung nahe, daß das Enzym lichtempfindlich sei. Um diese Vermutung abzuklären, wurde die Stabilität des Enzyms im Licht (Deckenbeleuchtung des Kühlraums)

und im Dunkeln bei verschiedenen Bedingungen untersucht (2.2.7.3.2.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Stabilität der GPDH im Rohextrakt mit verschiedenen Zusätzen im Licht und im Dunklen.

Zeit (h)	Ansatz Nr. (nach 2.2.7.3.2.)									
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	7a	7b
0	100	100	76	80	94	94	92	92	78	78
20	75	85	105	83	91	91	87	108	82	101
30	58	69	87	100	85	74	86	95	74	85
43	53	74	77	80	72	85	87	78	77	87

Erste Zeile: % der Aktivität von Ansatz 1a
Zweite Zeile: % der Zeile 1 (Ausgangsaktivität der Ansätze)

3.2.3.3. Beleuchtung der Enzymlösung

Beleuchtungsversuche, bei denen definierte Wellenlängen im Bereich der Absorptionsmaxima von Eluaten der DEAE-Sephadex eingestrahlt wurden, brachten keinen Unterschied in der GPDH-Aktivität zwischen belichteten und unbelichteten Proben. Die Absorptionsspektren waren von Isolierung zu Isolierung sehr unterschiedlich (Abbildung 3). Sie sind also offenbar nicht enzymspezifisch, sondern auf koeluierte Substanzen zurückzuführen, deren Gehalte in den Eluaten der AMP-Sepharose stark variieren. Diese Substanzen könnten bei der Belichtung als Energieüberträger fungieren.

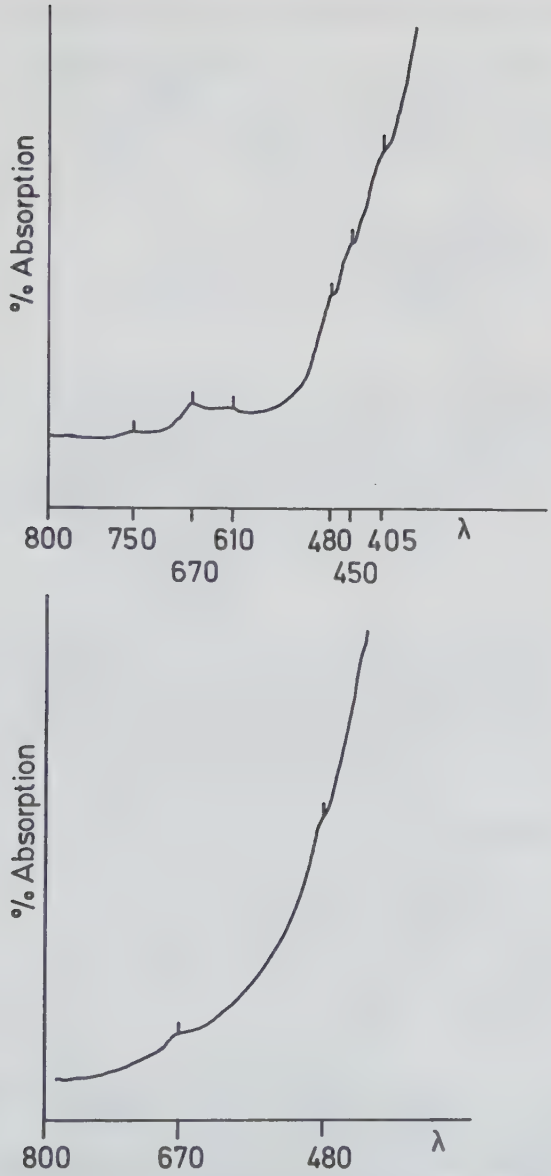


Abb. 3: Absorptionsspektren von teilweise gereinigten GPDH-Lösungen aus der Chromatographie zweier verschiedener *Dunaliella*-Rohextrakte an DEAE-Sephadex nach 2.2.14.4.

3.3. Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose Cl 6B

Es wurde in verschiedenen Puffersystemen versucht, eine Reinigung der GPDH aus dem Rohextrakt durch Chromatographie an AMP-Sepharose zu erreichen (Abbildungen 4a-e).

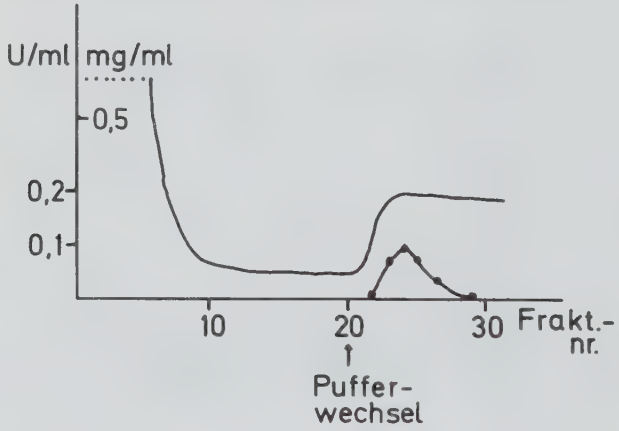


Abb. 4a: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an AMP-Sepharose. Säule: 2,6 x 3,5 cm, Flußrate: 16 cm/h, Frakt.Volumen: 2 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM KPP. Isolationspuffer pH 6,8. Ab Fraktion 20 Elution mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,0.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

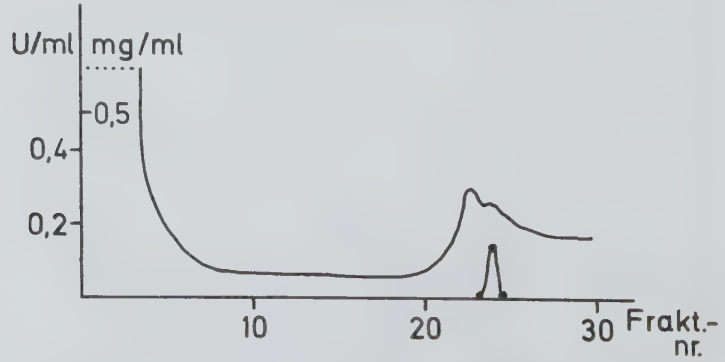


Abb. 4b: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an AMP-Sepharose. Säule, Flußrate und Frakt.Volumen wie Abb. 4a. Auftrag und Waschen mit 100 mM KPP-Isolationspuffer pH 6,8. Ab Fraktion 17 Elution mit linearem pH-Gradienten (100 mM KPP-Isolationspuffer pH 7-10)
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

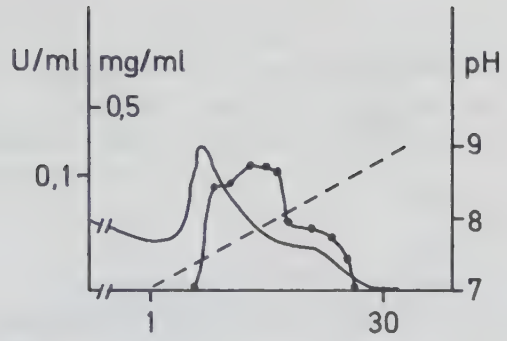


Abb. 4c: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an AMP-Sepharose. Säule, Flußrate und Frakt.Volumen wie Abb. 4a. Auftrag und Waschen mit 100 mM KPP-Isolationspuffer pH 6,8. Ab Fraktion 1 Elution mit linearem pH-Gradienten (100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7-9).
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

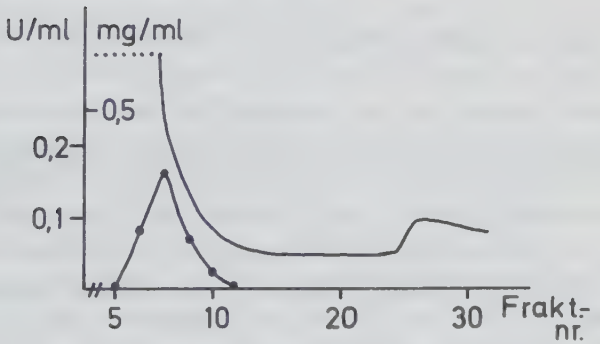


Abb. 4d: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an AMP-Sepharose. Säule, Flußrate und Frakt.Volumen wie Abb. 4a. Auftrag und Waschen mit 10 mM TRIS-Isolationspuffer pH 6,8. Bei Frakt. 24 Wechsel auf 10 mM TRIS-Isolationspuffer pH 9,5.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.
Die Systeme d und f (2.2.8.) ergaben entsprechende Elutionsprofile.

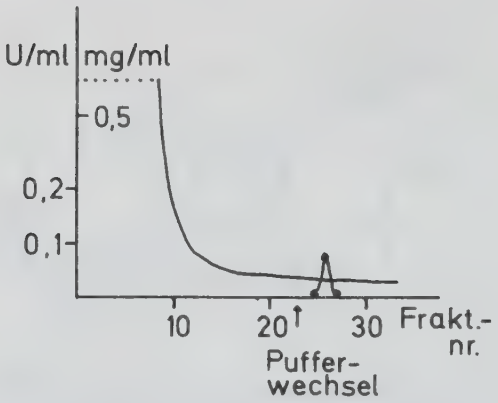


Abb. 4e: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an AMP-Sepharose. Säule, Flußrate und Frakt.Volumen wie Abb. 4a. Auftrag und Waschen mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer pH 7,0 mit 50 mM DL-α-Glycerinphosphat. Ab Fraktion 23 Elution mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer ohne Glycerinphosphat.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

In einigen Puffersystemen (Abbildungen 4a-c, e) war eine Bindung der GPDH mit nachfolgender Elution möglich. Es zeigte sich jedoch bei allen nachfolgenden Optimierungsversuchen, daß einerseits die Kapazität der AMP-Sepharose für die GPDH im Rohextrakt sehr niedrig war, andererseits die Proteinkonzentration in den Säuleneluaten noch sehr hoch waren, so daß weitere Reinigungsschritte im Anschluß an die AMP-Sepharose Chromatographie notwendig gewesen wären. Das größte Problem war jedoch die Tatsache, daß die Versuche z.T. gar nicht reproduzierbar waren.

3.4. Phosphatbestimmung am Säulenmaterial

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Chromatographien des Rohextrakts an AMP-Sepharose deutete darauf hin, daß das Säulenmaterial durch den Rohextrakt verändert wurde. Die

Phosphatbestimmung an AMP-Sepharose, mit der schon einige Isolierungsexperimente durchgeführt worden waren, ergab 1,17 µMol Phosphat/ml gequollenes Gel. Laut Herstellerangaben enthält 1 ml gequollenes Gel 2 µMol AMP bzw. Phosphat. Das Säulenmaterial enthielt also nur noch 59 % des ursprünglich vorhandenen AMP.

3.5. Aktivitätsbestimmung der 5'-Nucleotidase im Rohextrakt

Der Nucleotidasetest nach 2.2.10. zeigte im Rohextrakt die Anwesenheit von 5'-Nucleotidase-Aktivität:

a) Reagentienleerwert:	0,14 mM	Phosphat
b) Rohextrakt im Nucleotidase-Test:	2,34 mM	"
c) Phosphatkonzentration im Rohextrakt:	1,43 mM	"

Die Konzentration des enzymatisch freigesetzten Phosphats aus AMP ergibt sich nach (b)-(c)-(a) zu 4,68 µMol/ml · h. Das entspricht auf Grund der Verdünnung im Test einer Nucleotidase-Aktivität im Rohextrakt von 6,6 µMol/ml · h.

3.6. Versuche zur Hemmung oder Entfernung der 5'-Nucleotidase

3.6.1. Hemmung der Nucleotidase durch Fluorid

Bei Versuchen zur Hemmung der Nucleotidase im Rohextrakt zeigten sich keine Unterschiede zwischen Testansätzen nach 2.2.10. mit und ohne $MgCl_2$. Der Zusatz von 100 mM NaF reduzierte die Aktivität auf 33 %.

3.6.2. Hemmung der Nucleotidase durch Fluorid, Silicat und Komplexbildner

Die Auswertung der Versuche mit EDTA-Zusatz war schwierig, weil in einigen Proben eine Trübung auftrat, die die Phosphatmessung störte. Auch die Werte mit Silicat-Zusatz wurden z.T. durch Trübung beeinträchtigt. Wie Tabelle 5 zeigt, verringert der EDTA-Zusatz die Aktivität der Nucleotidase erheblich; mit EDTA + Silicat ist sie praktisch 0. Die Aktivität der GPDH im Rohextrakt wurde durch die Zusätze nicht beeinträchtigt. Nach Zusatz von 50 mM NaF + 50 mM Na_2SiO_3 zum Rohextrakt zur Hemmung der Nucleotidase wurde die GPDH jedoch nicht mehr an AMP-Sepharose gebunden.

Tabelle 5: Hemmung der Nucleotidaseaktivität im Rohextrakt

Nucleotidasetest	Aktivität im Rohextrakt mit H_2O	Aktivität im Rohextrakt mit H_2O/ 10 mM EDTA
Normaltest n. 2.2.10.	100 %	56 %
Test ohne $MgCl_2$	54 %	29 %
Test + 100 mM NaF	29 %	13 %
Test + 100 mM Na_2SiO_3	nicht auswertbar	0 %

3.6.3. Versuch der Abtrennung der Nucleotidase

Da nach Hemmung der Nucleotidase im Rohextrakt eine Bindung der GPDH an die AMP-Sepharose nicht möglich war, wurde versucht, durch Gelchromatographie an Sephadex G-150 bzw. an Sephacryl S-200 die Nucleotidase im Rohextrakt von der GPDH abzutrennen. Eine Trennung der beiden Enzyme konnte nicht erreicht werden, da beide Aktivitäten nahezu deckungsgleich

von der Säule eluiert wurden. Die Gesamtaktivität der Nucleotidase war nach der Chromatographie allerdings auf 15 % zurückgegangen. Die Aktivität im Rohextrakt war insgesamt 20100 U; nach der Chromatographie an Sephacryl waren es nur noch 3100 U. Die Gesamtaktivität der GPDH im Eluat betrug dagegen 180 % der auf die Säule aufgetragenen Aktivität.

3.7. Phosphatgehalt von *Dunaliella*-Zellen

Da Phosphat einerseits ein starker Inhibitor der GPDH ist (siehe Tab. 1) und andererseits im Rohextrakt eine gegenüber dem Nährmedium um den Faktor 10 erhöhte Phosphatkonzentration vorliegt, wurde untersucht, ob während der Osmoregulationsphase größere Schwankungen im Phosphatgehalt der Algenzellen feststellbar sind.

3.7.1. Phosphatgehalte von Algenzellen im osmotischen steady state

Die Aufarbeitung der Algenzellen nach 2.2.12.1. ergab die folgenden Werte:
Phosphat in Algen aus 2 % NaCl-Nährmedium: 2,97 mM ≙ 100 %
Phosphat in Algen aus 6 % NaCl-Nährmedium: 2,84 mM ≙ 96 %
Die weiteren ERgebnisse sind in Tabelle 6a zusammengefaßt.

3.7.2. Phosphatgehalte von Algen während der Osmoregulation

Durch das Weglassen der zeitraubenden isotonischen Waschvorgänge wurde die Zeitspanne zwischen Mediumwechsel und Lyse der Algenzellen stark verkürzt. Dadurch befanden sich die Algen beim Entfernen des Mediums und bei der Lyse noch in der Osmoregulationsphase. Die Tabellen 6b-c zeigen die Ergebnisse verschiedener Versuche nach 2.2.12.2.

Tabelle 6: Phosphatgehalt von Algen während der Osmoregulation.

a) Verfahrensschritt	2 % Medium	6 % Medium	10 % Medium
Vol. der Ausgangssuspension	50 ml	50 ml	48,1 ml
"wet packed volume" (gesamt)	1,40 ml	1,90 ml	1,34 ml
Vol. H_2O zur Lyse	3,00 ml	3,03 ml	3,00 ml
PO_4 im Lyseüberstand	0,625 mM	0,578 mM	0,541 mM
PO_4 im wet packed volume	1,4 mM	0,97 mM	1,26 mM
	100 %	69,5 %	90 %

b) Verfahrensschritt	Phosphatgehalt
Überstand vor der Lyse 6 %	0 mM
Überstand vor der Lyse 10 %	0 mM
wet packed volume 6 %	3,58 mM ≙ 100 %
wet packed volume 10 %	3,34 mM ≙ 93 %

c) Verfahrensschritt	Phosphatgehalt
6 % NaCl-Nährmedium	0,133 mM
10 % NaCl-Nährmedium	0,132 mM
Algenüberstand (6 Ü)	0,013 mM
Überstand nach Medienwechsel	
(6 $Ü_1$)	0,008 mM
(10 $Ü_1$)	0,041 mM
wet packed volume (6 A)	1,96 mM ≙ 100 %
wet packed volume (10 A)	1,62 mM ≙ 84 %

Die Phosphatwerte der Algen in der Osmoregulationsphase zeigen dasselbe Verhalten wie die der Algen im steady state. In allen Versuchen liegen in Algen aus Medien der höheren Salzkonzentrationen leicht erniedrigte Phosphatkonzentrationen vor. Eine Ausnahme bildet der Wert für die Algen aus 6 % NaCl-Medium im Versuch 3.7.2.a). Die Gesamtzellmasse/Nährlösungsvolumen liegt hier jedoch wesentlich höher als in den anderen Suspensionen. Die Werte für die Phosphat-Konzentrationen im Lyseüberstand, die ein Maß sind für die Phosphatmenge in den Algensuspensionen, zeigen bei den 6 % Algen das gleiche Verhalten wie die der anderen Algensuepensionen. Diese Werte verhalten sich wie 100:91:89,1.

Auffällig sind die großen Unterschiede in den Absolutwerten von Algen aus verschiedenen Kulturen gleicher Salzkonzentration. Sie sind wahrscheinlich abhängig von der Gesamtzellmasse im Nährlösungsvolumen und der Zelldichte beim Überimpfen. Aus den Werten der Überstände vor der Lyse in 3.7.2.b) und den Werten 6Ü, $6Ü_1$ und $10Ü_1$ in 3.7.2.c) geht hervor, daß die Algen äußerst schnell Phosphat entgegen einem Konzentrationsgefälle aus dem Medium in die Zellen aufnehmen. Die Konzentration in den Zellen ist 10-20 mal höher als die im frischen Medium (3.7.2.c). Bei der Zellteilung verringert sich der Phosphatgehalt wieder, da das Phosphat auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt wird.

3.8. Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen

Die Ergebnisse der Bestimmung des osmotischen Volumens sind in Abbildung 5 und in Tabelle 7 dargestellt. Bei Extrapolation des relativen Volumens auf NaCl = ∞ ergibt sich ein Grenzwert von ca. 30 % und somit ein osmotisches Volumen von ca. 70 %. Die Werte sind Mittelwerte aus Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen.

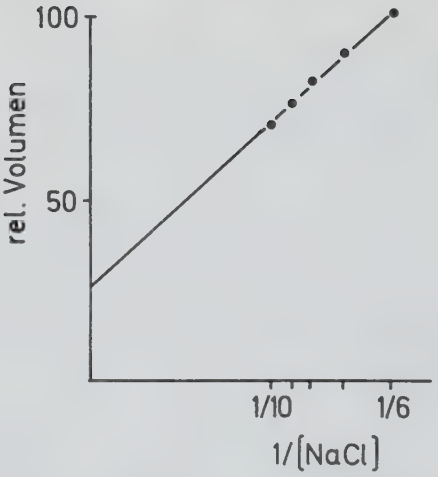


Abb. 5: Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen

Tabelle 7: Bestimmung des osmotischen Volumens

Nährlösung	Relatives Volumen
6,00 % NaCl	100,0 %
7,16 % NaCl	89,5 %
8,16 % NaCl	82,5 %
8,9 % NaCl	76,5 %
10,0 % NaCl	67,5 %

3.9. Chromatographie der GPDH an DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex

3.9.1. Vorversuche

Die Vorversuche (2.2.14.1.) zeigten, daß die GPDH bei allen untersuchten pH-Werten auf dem Ionenaustauscher bindet. Eine Elution durch Veränderung des pH-Wertes (bei dieser Möglichkeit werden die wenigsten Störfaktoren in die Enzymlösung eingetragen) war daher nicht möglich, zumal das Enzym im Rohextrakt bei pH <6,8 ausfällt. Mit 1 M KCl wird die GPDH jedoch vom Austauscher freigesetzt. Beide untersuchten Ionenaustauscher zeigten die gleichen Ergebnisse. Bei beiden Austauschern blieb jedoch auch bei hohen Ionenkonzentrationen ein gelbes Pigment auf dem Gel, das erst mit hohen Ethanol-Konzentrationen (ca. 80 %) ausgewaschen werden konnte.

3.9.2. Gradientenelution

Bei der Elution der GPDH mit einem linearen KCl-Gradienten von 0-1 M (2.2.14.3.) wurde im Eluat keine Enzymaktivität gefunden. Bei diesem Versuch war ein Rohextrakt mit sehr niedrigem Proteingehalt (1 mg/ml) aufgetragen worden. Eine Kontrolle der GPDH-Aktivität in einem nicht auf die Säule aufgegebenen Aliquot des Rohextraktes ergab während der Zeit des Säulenlaufs einen Rückgang der Ausgangsaktivität auf 30 %. Dies legt den Schluß nahe, daß das Enzym während der Säulenchromatographie vollständig inaktiviert wurde.

In einem weiteren Versuch wurde ein Rohextrakt mit durchschnittlicher Proteinkonzentration (6 mg/ml) aufgetragen und die GPDH mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-2 M eluiert. Die Ausbeute betrug 75 % der aufgetragenen Aktivität; der Anreicherungsfaktor war 4,8; die Volumenaktivität in der

Peakfraktion war 0,18 U/ml und die spezifische Aktivität 0,72 U/mg (Abb. 6).

Die Elution mit einem flacheren Gradienten von 0-0,25 M NaCl erbrachte nur eine Ausbeute von 31 %. Der Aktivitätspeak war wesentlich flacher als bei dem steileren Gradienten; auch die Verweildauer des Enzyms auf der Säule war wesentlich größer.

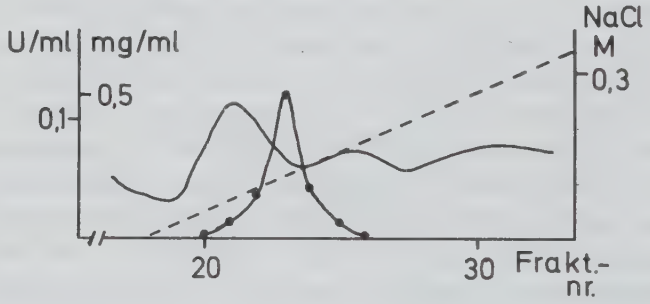


Abb. 6: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an DEAE-Sepharose. Säule: 1,6 x 15 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 4 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer, pH 7,5. Ab Fraktion 18 Elution mit linearem NaCl-Gradienten 0-2 M in TRIS-Isolationspuffer.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität, (---) Verlauf des Gradienten.

3.9.3. Bestimmung der Desorptionskonzentration mit NaCl

Um eine Stufenelution mit kurzer Verweildauer des Enzyms auf der Säule zu ermöglichen, wurde die Konzentration von NaCl bzw. im Experiment die Leitfähigkeit des Puffers bei einer Gradientenelution von 0-0,25 M NaCl bestimmt, bei der das Enzym vom Ionenaustauscher verdrängt wurde. Die Leitfähigkeit im Eluat betrug unmittelbar vor dem Enzympeak 19 mS/cm und in der Fraktion nach dem Aktivitätspeak 21 mS/cm.

3.9.4. Stufenelution der DEAE-Sephadex A-25 Säule

Um das Enzym während des Waschens auf der Säule zu stabilisieren, wurde mit Auftragspuffer + 500 µg BSA/ml (2.2.14.4.) gewaschen. Die Elution mit Auftragspuffer + NaCl ≙ 21 mS/cm erbrachte einen sehr steilen Aktivitätspeak mit einer Gesamtaktivität von 94 % des aufgetragenen Rohextrakts. Bei einem entsprechenden Versuch ohne BSA im Waschpuffer wurde nur eine Ausbeute von 38 % erreicht.

Bei einer Vergrößerung der aufgetragenen Rohextraktmenge band das Enzym nicht mehr an den Austauscher, sondern eluierte hinter der Hauptproteinmenge im Durchlauf. Die Messung der Leitfähigkeit in der ersten Fraktion des Durchlaufs mit GPDH-Aktivität ergab einen Wert von 170 mS/cm. Das Enzym wurde offenbar von nachfolgenden, durch den Ionenaustauscher konzentrierten Ionen eluiert. Um daher auf dem Ionenaustauscher reproduzierbare Werte zu erhalten, wäre es nötig gewesen, der Säule eine Gelchromatographie vorzuschalten. Da nach den Untersuchungen von WEINS (1978) wie auf Grund eigener Erfahrungen die Gelchromatographie an Sephadex das Enzym labilisiert, wurde dieser Weg nicht eingeschlagen.

3.10. Stabilisierung und Reaktivierung der GPDH durch Glycerin-3-Phosphat

Bei einem Versuch, das von der DEAE Sephadex-Säule eluierte Enzym auf AMP-Sepharose aufzutragen, wurde die Enzymlösung mit 10 mM G-3-P versetzt. Dabei zeigte sich eine Aktivierung des Enzyms um 100 %. Eine Erhöhung der G-3-P-Konzentration im Enzymtest nach 2.2.5.1. auf 10 mM ergab keine Erhöhung der Enzymaktivität.

Der Zusatz von 100 mM G-3-P zu den aktiven Fraktionen einer DEAE-Sephadex-Elution nach 2.2.14.4. konnte die GPDH erheblich stabilisieren und aktivieren (Tabelle 8).

Tabelle 8: Einfluß von Glycerin-3-Phosphat auf die GPDH-Aktivität

Verfahrensschritt	relative Enzymaktivität in %
DEAE-Säuleneluat	100
+ 100 mM G-3-P nach 30 min	214
nach 3 1/2 h	286

DieErhöhung der G-3-P-Konzentration auf 150 mM führte zu einer Steigerung der Enzymaktivität nach 3 1/2 h auf 357 %.

Der stabilisierende und aktivierende Effekt des G-3-P auf die GPDH zeigte sich auch bei einem anderen Versuch: Die Eluate einer DEAE-Sephadex-Säule wurden über eine Sephadex G-50-Säule umgepuffert. Dabei konnte in dem eluierten Proteinpeak keine GPDH-Aktivität gefunden werden. Durch Zugabe von 150 mM G-3-P zu den proteinhaltigen Fraktionen wurde die Aktivität soweit wiederhergestellt, daß die Wiederfindungsrate 70 % erreichte.

3.11. Chromatographie der GPDH an Hydroxyapatit

3.11.1. Stufenelution mit Glycerin-3-Phosphat

Auf Grund der starken Hemmung der GPDH im Rohextrakt durch Phosphatpuffer (siehe Tabelle 1) lag die Vermutung nahe, daß das Enzym an Hydroxyapatit gebunden wird. Ein Vorversuch (2.2.16.1.) bestätigte die Bindung der GPDH an das Säulenmaterial, eine Elution durch Erhöhung der Salzkonzentration konnte jedoch nicht erreicht werden. Die übliche Methode der Elution mit Phosphat war auf Grund der starken Enzymhemmung

nicht anwendbar. Ein erster Versuch, die GPDH mit 150 mM G-3-P vom Hydroxyapatit zu eluieren, ergab eine Trennung von Proteinpeak und eluierter GPDH (Abb. 7a); mit einem Anreicherungsfaktor von 16 und einer spezifischen Aktivität von

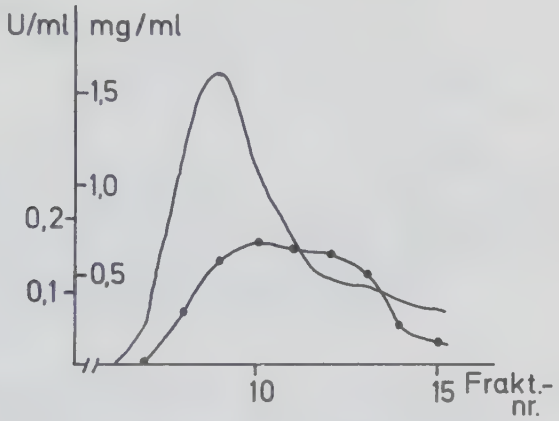


Abb. 7a: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an Hydroxyapatit. Säule: 5 x 2,5 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 9 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer, pH 8,2. Ab Fraktion 1 Pufferwechsel auf Glycin-Isolationspuffer mit 150 mM G-3-P.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.
Elutionsprofil des ersten Versuches.

0,34 U/mg in der Peakfraktion. Weitere Versuche zur Reproduzierbarkeit dieser Methode konnten jedoch eine Trennung von Protein- und Enzympeak nicht bestätigen (Abb. 7b). Die Summierung der Proteingehalte über die aktiven Fraktionen zeigte zudem, daß beim Auftragen des Rohextraktes und beim Waschen der Säule keine Abtrennung von Protein erfolgte.

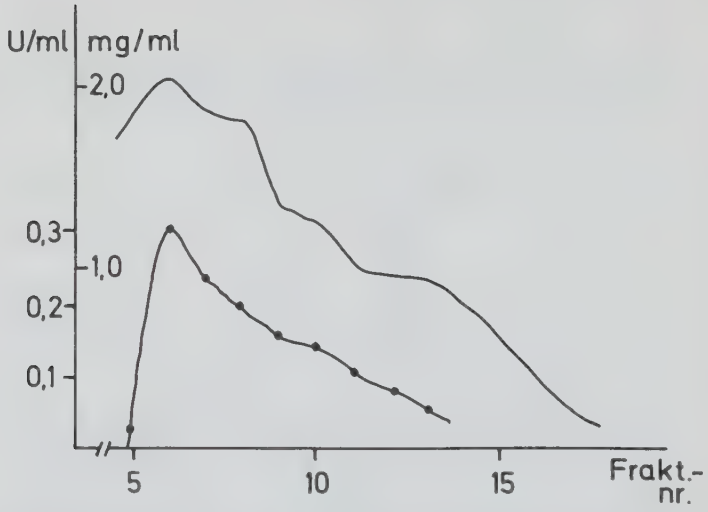


Abb. 7b: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an Hydroxyapatit. Säule: 5 x 5 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 9 ml. Bedingungen wie bei Abb. 7a. (——) Protein (-●-) GPDH-Aktivität. Elutionsprofil eines typischen Versuches.

3.11.2. Gradientenelution mit Glycerin-3-Phosphat

Da die Proteine des Rohextraktes offenbar quantitativ auf der Hydroxyapatit-Säule gebunden wurden, wurde versucht, eine Reinigung der GPDH mit einem linearen G-3-P-Gradienten zu erreichen. Das Enzym begann jedoch schon bei sehr niedrigen G-3-P-Konzentrationen von der Säule zu eluieren. Bei steigender G-3-P-Konzentration stieg die eluierte Enzymmenge proportional zur eluierten Proteinmenge an. Eine Reinigung war auf diesem Wege somit nicht zu erreichen (Abbildung 8).

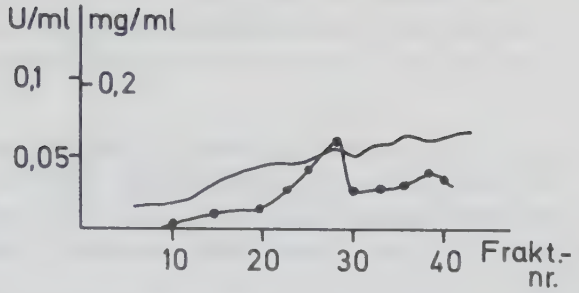


Abb. 8: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an Hydroxyapatit. Säule: 5 x 5 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 9 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer, pH 8,2. Ab Fraktion 1 Elution mit linearem Gradienten von 0-200 mM G-3-P in Glycin-Isolationspuffer.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

3.12. Affinitätschromatographie an Cibacron Blue Sepharose

3.12.1. Vorversuche zur Bindung und Elution der GPDH aus dem Rohextrakt an Blausepharose

Nach Auftragen eines *Dunaliella*-Rohextrakts auf Blausepharose im Reagenzglas konnte im Überstand keine GPDH-Aktivität mehr gemessen werden. Allerdings konnte durch Zugabe von NAD zum Puffer (2.2.18.1.) auch aus dem Gel keine GPDH-Aktivität freigesetzt werden.

3.12.2. Enzymtest mit Dextranblau

Um die Bindung an den Farbstoff bzw. die Aufhebbarkeit der Bindung durch NAD zu untersuchen, wurde zum Enzymtest nach 2.2.5.1. Dextranblau zugegeben (3.3.28.2.). Es ergab sich eine 55 %ige Hemmung der GPDH-Aktivität im Vergleich zur

Kontrolle; die Hemmung konnte durch NAD jedoch nur teilweise aufgehoben werden: bei Erhöhung der NAD-Konzentration im Test von 3,8 mM auf 7,6 mM stieg die Aktivität von 55 % auf 65 %.

In einem weiteren Testansatz wurde die Dextranblaulösung direkt zum Rohextrakt gegeben und diese Mischung im Enzymtest eingesetzt. In diesem Fall war eine 100 %ige Hemmung zu beobachten, die durch NAD nicht beeinflußt werden konnte.

3.12.3. Chromatographie von Eluaten der Hydroxyapatitsäule an Blausepharose

Beim Auftragen eines Hydroxyapatit - Säuleneluats auf Blausepharose im Reagenzglas mit 150 mM G-3-P im Puffer wurde das Enzym vom Blaugel nur sehr langsam gebunden. Die Adsorption an das Gel dauerte ca. 30 min. Die Freisetzung der GPDH war schon mit sehr geringen NAD-Konzentrationen möglich. Mit 0,06 mM NAD wurde eine maximale Desorption allerdings erst nach 2 h beobachtet.

Vorversuche an einer mit Blaugel gefüllten Säule zeigten, daß die Bindung des Enzyms an das Gel unter diesen Bedingungen sehr viel schneller verläuft. Es konnte ohne große Aktivitätsverluste eine Flußrate von 10 cm/h angewendet werden (2.2.18.3.2.). Auch die Desorption des Enzyms, allerdings bei höherer NAD-Konzentration, war nur leicht verzögert. Das Enzym eluierte nicht im Hauptproteinpeak, so daß bei Verwendung von 1 mM NAD im Elutionspuffer eine spezifische Aktivität von 33 U/mg erreicht werden konnte (Abb. 9). Das Enzym eluierte allerdings nicht in Peakform, sondern als Plateau mit einer Volumenaktivität, die für enzymkinetische Messungen nicht ausreichend war. Sie betrug maximal 0,5 U/ml, sowohl bei Elution mit 20 mM (Abb. 10) wie auch mit 1 mM NAD.

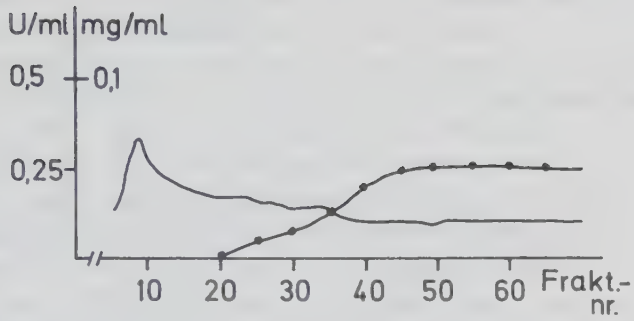


Abb. 9: Chromatographie von Hydroxyapatit-Säuleneluat an Blausepharose. Säule: 2,6 x 8 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 3,5 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer, pH 8,2 mit 150 mM G-3-P. Ab Fraktion 1 Elution mit Glycin-Isolationspuffer + G-3-P mit 1 mM NAD.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

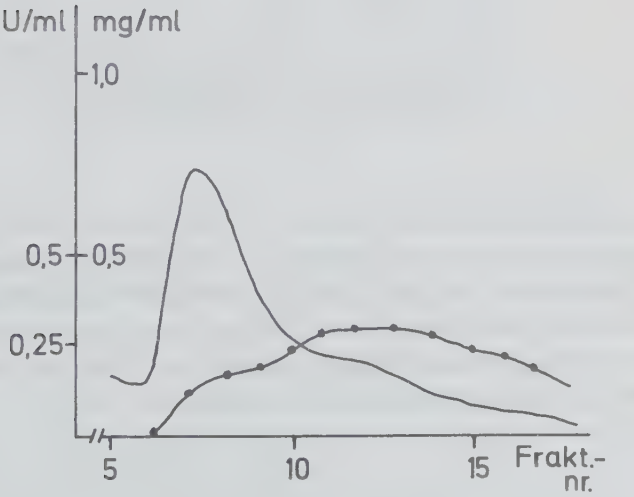


Abb. 10: Chromatographie von Hydroxyapatit-Säuleneluat an Blausepharose. Säule: 2,6 x 8 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 5 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer, pH 8,2 mit 150 mM G-3-P. Ab Fraktion 1 Elution mit Glycin-Isolationspuffer + G-3-P mit 20 mM NAD.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

Ein Elutionsversuch mit 5 mM NAD ohne G-3-P erbrachte praktisch keine Desorption von Enzymaktivität. Offenbar wird ohne G-3-P das Enzym zum großen Teil irreversibel an das Gel gebunden (Abb. 11).

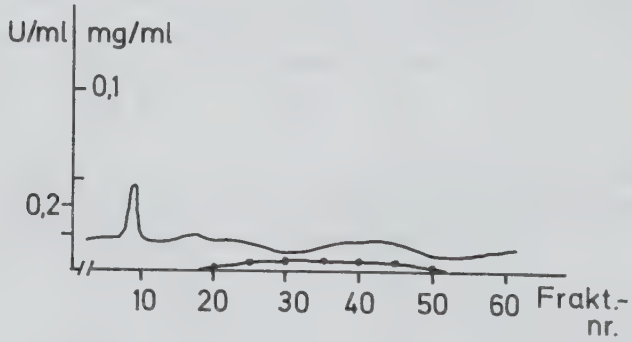


Abb. 11: Chromatographie von Hydroxyapatit-Säuleneluat an Blausepharose. Säule: 2,6 x 8 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 4 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer + 150 mM G-3-P. Nach 400 ml wurde mit 8 ml Puffer ohne G-3-P zwischengewaschen. Ab Fraktion 1 Elution mit Glycin-Isolationspuffer mit 5 mM NAD.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

Um die gleichzeitige Anwesenheit von Substrat (G-3-P) und Coenzym (NAD) in den Eluaten vom Blaugel zu vermeiden, wurde versucht, die GPDH durch unspezifische Desorption zu eluieren. Aber sowohl mit NaCl wie auch mit Ethylenglycol (2.2.18.3.4.) wurde das Enzym wesentlich schlechter und unvollständiger eluiert als mit NAD.

3.13. Versuch zur Konzentrierung der GPDH aus den Eluaten der Blausepharose-Säule

Da die Reinigung der GPDH auf der Blausepharose-Säule sehr gute spezifische Aktivitäten erbracht hatte, wurde versucht, den Nachteil der niedrigen Volumenaktivität durch eine Konzentrierung an DEAE-Sephadex auszugleichen. Die gesamte Enzymaktivität erschien allerdings im Durchlauf; dabei wurde jedoch eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf das Doppelte beobachtet. Eine Berechnung ergab, daß die theoretische Kapazität des Gelbetts ziemlich genau der im Auftragsvolumen enthaltenen Menge G-3-P entsprach. Es ist daher anzunehmen, daß zunächst G-3-P an die Austauschergruppen gebunden wird und das Enzym deshalb durch die Säule durchläuft. Dies wird auch durch den Befund gestützt, daß die aktiven Fraktionen des Durchlaufs sehr schnell ihre Aktivität verloren.

3.14. Versuch zur Entfernung von G-3-P und NAD aus den Eluaten der Blausepharose-Säule

Zur Entfernung der Metabolite in den Eluaten der Blausepharose-Säule wurde versucht, die starke Bindung des G-3-P an DEAE-Sephadex auszunützen. Die Methode erbrachte in Bezug auf die Entfernung von G-3-P sehr gute Ergebnisse: eine Behandlung der Enzymlösung mit dem 1,5-fachen Volumen Austauschergel entfernte das in der Lösung enthaltene G-3-P vollständig. Dabei wurde ein geringfügiger Verlust an Enzym beobachtet. Eine quantitative Beurteilung war allerdings nicht möglich, da durch die Entfernung von G-3-P die Produkthemmung im Enzymtest nach 2.2.5.2. wegfiel. Tatsächlich wurde in einigen Fällen eine Aktivitätssteigerung bis auf 150 % im Test beobachtet. Es war jedoch schwierig, die Austauschermenge genau zu reproduzieren. Mit einem Kationenaustauscher konnte jedoch NAD nicht entfernt werden.

3.15. Optimierung der Affinitätschromatographie an Blausepharose

Bei der Affinitätschromatographie mit 150 mM G-3-P konnte mit keinem der in 2.2.19.1. aufgelisteten Puffersysteme eine für die Enzymkinetiken ausreichende Volumenaktivität der GPDH erhalten werden. Da die Versuche mit Dextranblau im Enzymtest (3.12.2.) gezeigt hatten, daß auch die Gegenwart von G-3-P die Bindung des Farbstoffes an das Enzym beeinflußt, wurde in einem Versuch die Konzentration von G-3-P im Elutionspuffer auf 200 mM erhöht. Dadurch veränderte sich das Elutionsprofil in charakteristischer Weise: das Enzym eluierte nun an der Elutionspufferfront in einer schmalen Bande. Dadurch konnten wesentlich höhere Volumenaktivitäten erreicht werden. Allerdings lag dabei der Enzympeak direkt über dem ersten Proteinpeak, so daß die spezifische Aktivität nicht sehr hoch war (ca. 3,9 U/mg) (Abb. 12a).

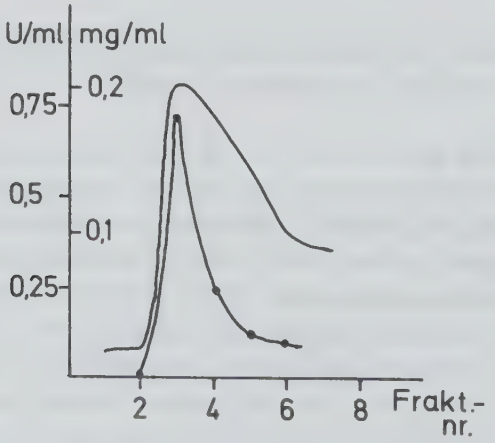


Abb. 12a: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an Blausepharose. Säule: 2,6 x 8 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 9 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer + 200 mM G-3-P pH 8,2. Ab Fraktion 1 Elution mit Glycin-Isolationspuffer + 200 mM G-3-P + 20 mM NAD. (——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

Durch eine Reduzierung der NAD-Konzentration im Elutionspuffer auf 5 mM verringerte sich zwar die Proteinkonzentration im Eluat; gleichzeitig wurde aber auch die Volumenaktivität verringert, sodaß keine bessere Reinigung resultierte (Abb. 12b).

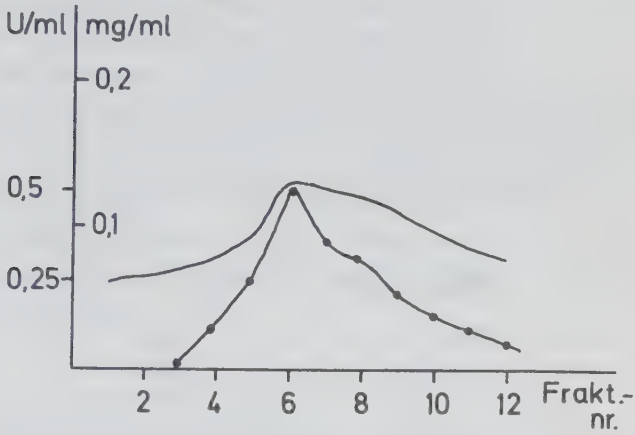


Abb. 12b: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an Blausepharose. Säule: 2,6 x 8 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 5 ml. Auftrag und Waschen mit 100 mM Glycin-Isolationspuffer + 200 mM G-3-P pH 8,2. Ab Fraktion 1 Elution mit Glycin-Isolationspuffer + 200 mM G-3-P + 5 mM NAD. Bei Verwendung des entsprechenden Systems mit 100 mM TRIS-Isolationspuffer wird dasselbe Elutionsprofil erhalten.
(——) Protein, (-●-) GPDH-Aktivität.

Zur weiteren Optimierung wurde die Konzentration von G-3-P im Puffer auf 250 mM erhöht und die Chromatographie an Hydroxyapatit weggelassen, um die Reinigungsprozedur zu beschleunigen. Beide Maßnahmen erbrachten jedoch keine Steigerung der spezifischen Aktivität.

Eine Vorelution von inaktivem Protein durch NaCl oder niedrige NAD-Konzentrationen gelang nicht, da schon bei geringen NaCl- bzw. NAD-Konzentrationen das Enzym von der Säule

eluiert wurde. Eine gewisse Verbesserung konnte durch Verwendung von 50 mM TRIS-Isolationspuffer als Grundlage der Säulenpuffer erzielt werden. Die spezifische Aktivität des eluierten Enzympeaks lag bei 10 U/mg, da die Elution von Fremdprotein verringert war.

Die entscheidende Maßnahme zur Verbesserung der Reinigung war es, die Blausepharose-Säule zu überladen. Es wurde eine der 4-fachen Säulenkapazität entsprechende Menge Rohextrakt aufgetragen. Dadurch konnten spezifische Aktivitäten in den Peakfraktionen von 45-65 U/mg erreicht werden. Dies entspricht einer 86-130-fachen Reinigung. Die mit diesem Verfahren erreichte durchschnittliche Aktivität der gepoolten Enzymfraktionen betrug 29 U/mg (Abb. 13).

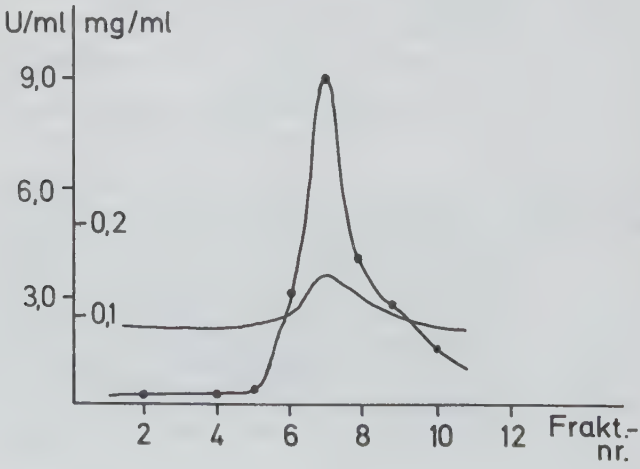


Abb. 13: Chromatographie von *Dunaliella*-Rohextrakt an Blausepharose. Säule: 2,6 x 4 cm; Flußrate: 9 cm/h; Frakt.-Volumen: 2,5 ml. Auftrag und Waschen mit 50 mM TRIS-Isolationspuffer + 200 mM G-3-P pH 8,2. Ab Fraktion 1 Elution mit TRIS-Isolationspuffer + 200 mM G-3-P + 3 mM NAD. Die Menge des Rohextraktes betrug das 2-fache der Auftragsmengen von Abb. 19a/b bei halbiertem Säulenvolumen.

Beim Überladen der Säule wird offenbar spezifisch mehr Enzym gebunden, da sich die Proteinmenge im Elutionspeak nicht vergrößerte.

Das Eluat der mit Rohextrakt überladenen Blausepharose-Säule war auch nach dem Waschen mit 10 Bettvolumina Waschpuffer noch nicht proteinfrei; es enthielt stets 35-40 µg/ml Protein. Die Bestimmung der GPDH-Aktivität in den Waschfraktionen ergab einen konstanten Wert sowohl der spezifischen Aktivität wie auch der Volumenaktivität von 0,2 U/mg bzw. 0,1 U/ml. Ein weiteres Waschen war also mit einem erheblichen Enzymverlust verbunden; die Proteinmenge im Elutionspeak wurde jedoch kaum verringert. Es handelte sich bei dem Protein im Waschpuffer also hauptsächlich um schwach und unspezifisch gebundenes Protein, das nicht oder nur wenig durch die spezifische Elution der GPDH mit NAD von der Säule desorbiert wurde.

3.16. Regeneration der Blausepharose

Beim direkten Auftragen des Rohextraks auf die Blausepharose-Säule wurde stets ein Teil der im Rohextrakt enthaltenen grünen Pigmente an das Gel gebunden. Es bestand daher nach mehrmaligem Gebrauch der Säule die Gefahr des Verstopfens. Ein Teil der Pigmente und die unspezifisch gebundenen Proteine konnten durch Waschen mit 2 M NaCl entfernt werden. Die vollständige Entfernung dieser Substanzen gelang aber erst durch Waschen der Säule mit dem 15-fachen Bettvolumen 6 M Harnstoff. Nach Auswaschen der Harnstofflösung konnte die Blausepharose wieder zur Säulenchromatographie eingesetzt werden.

3.17. Entfernung von Substrat und Coenzym aus den Eluaten der Blausepharose-Säule

Beim Auftrag von 2 ml Enzymlösung auf eine Sephadex G-50 Säule (2,6 x 4 cm) konnte eine sehr gute Trennung von Enzym und Metaboliten bei geringstmöglicher Verdünnung erreicht werden. Durch die Chromatographie an Sephadex G-50 trat jedoch offenbar eine Inaktivierung des Enzyms ein, da ein Aktivierungseffekt wie an DEAE-Sephadex (3.14.) nicht beobachtet werden konnte. Durch die Gelchromatographie konnte eine zusätzliche Steigerung der spezifischen Aktivität um den Faktor 2 erreicht werden.

Die angegebenen Auftragsvolumina wurden daraufhin optimiert, daß die eluierte Enzymmenge bei den nachfolgenden enzymkinetischen Untersuchungen etwa innerhalb von 2 h aufgebraucht wurde. Nach der Entfernung des stabilisierenden Glycerin-3-Phosphats verlor das gereinigte Enzym bei längerem Stehen im Eiswasserbad merklich an Aktivität.

Hohe Konzentrationen an BSA (1,5 mg/ml) verbesserten die Stabilität zwar wesentlich; sie wurden jedoch nicht eingesetzt, um mögliche Störungen in den Kinetiken durch Interaktion mit dem Enzym oder den eingesetzten Metaboliten zu vermeiden.

3.18. Isolierung und Reinigung der GPDH aus *Dunaliella*

Auf Grund der oben beschriebenen Versuchsergebnisse wurde die Reinigung der GPDH aus *Dunaliella* durch Aufschluß der Algenzellen mit Ultraschall (2.2.2.3.), Affinitätschromatographie an Dextranblausepharose (2.2.19.2.) und anschließender Gelchromatographie an Sephadex G-50 (2.2.20.2.) durchgeführt. Mit diesem Verfahren konnte ein Maximalwert der spezifischen Aktivität von 144 U/mg und eine maximale Anreicherung um den Faktor 270 erreicht werden. Die Ergebnisse einer typischen Enzymisolierung sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Reinigung der GPDH aus *Dunaliella*

Reinigungs-schritt	Volumen (ml)	Gesamt-aktivität (U)	Protein (ges) (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Reini-gung (n-fach)	Aus-beute (%)
Rohextrakt	40	160	303	0,52	1	100
Affinitäts-chromatogr.	7,5	11	0,375	29,3	55	6,8
Gelchroma-tographie	12	10,6	0,162	66	126	6,0

3.19. Bestimmung der kinetischen Konstanten

Bei der Darstellung der Meßergebnisse (2.2.21.2. und 2.2.21.2.) nach HANES (Abb. 14a-d), bei der A/v gegen A aufgetragen wird, wurden Geradenscharen mit einem gemeinsamen Schnittpunkt links der y-Achse erhalten. Danach handelt es sich beim Reaktionstyp der GPDH aus *Dunaliella* um einen "ordered mechanism", wie er häufig bei Dehydrogenasen anzutreffen ist. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Kinetische Konstanten der GPDH aus *Dunaliella*

variiertes Substrat	K_M (mM)
DHAP	0,5
NADH	0,026
G-3-P	0,15
NAD	1,3

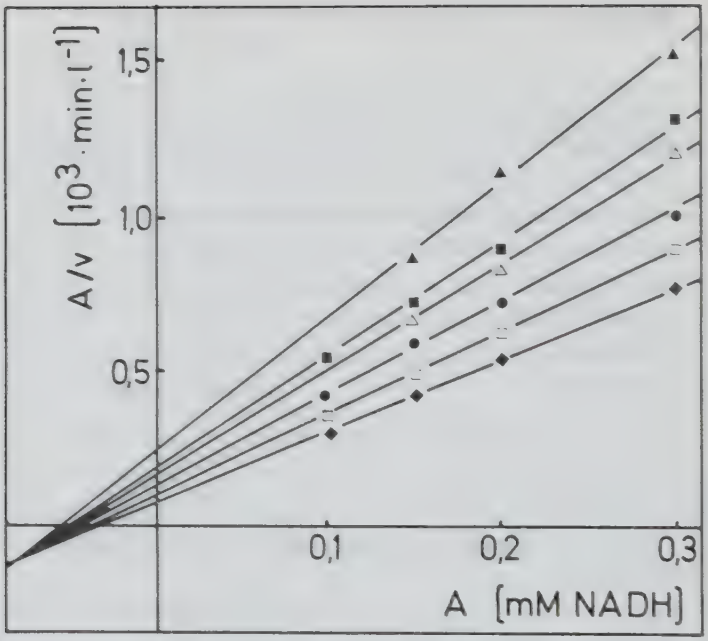
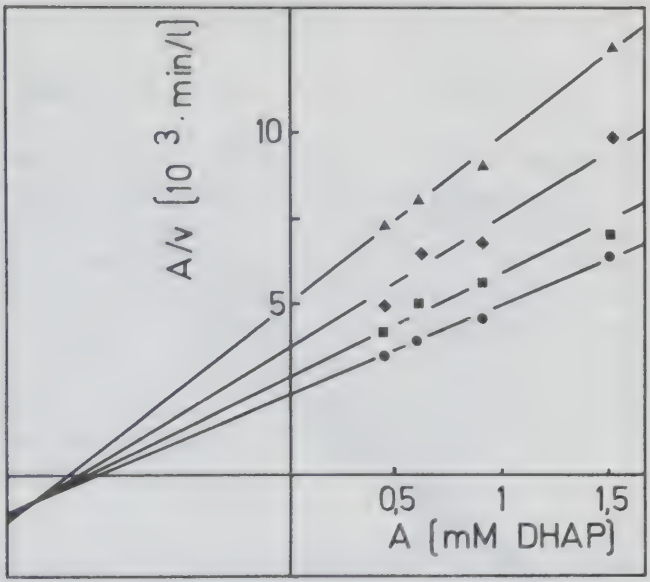
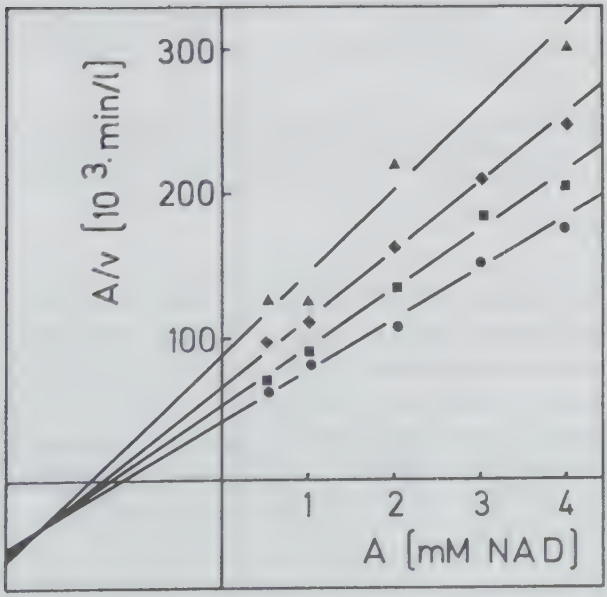


Abb. 14a: HANES-Diagramm der DHAP-Reduktion. NADH variiert bei verschiedenen Konzentrationen von DHAP. DHAP-Konz.: (-◆-) 0,3 mM; (-□-) 0,45 mM; (-●-) 0,6 mM; (-△-) 0,75 mM; (-■-) 1,05 mM; (-▲-) 1,5 mM.

Abb. 14b: HANES-Diagramm der DHAP-Reduktion. DHAP variiert bei verschiedenen Konzentrationen von NADH. NADH-Konz.: (-●-) 0,04 mM; (-■-) 0,06 mM; (-◆-) 0,1 mM; (-▲-) 0,15 mM.

Abb. 14c: HANES-Diagramm der G-3-P-Oxidation. NAD variiert bei verschiedenen Konzentrationen von G-3-P. G-3-P-Konz.: (-●-) 0,33 mM; (-■-) 0,5 mM; (-◆-) 1 mM; (-▲-) 2 mM.


A/v [10 3. min/l]
10
5
0,5
1
1,5
A [mM DHAP]


A/v [10 3. min/l]
300
200
100
1
2
3
4
A [mM NAD]

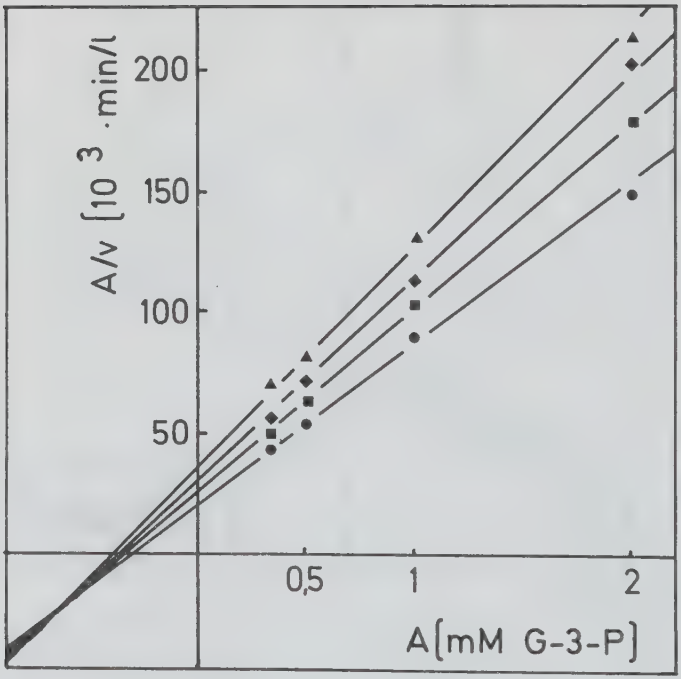


Abb. 14d: HANES-Diagramm der G-3-P-Oxidation. G-3-P variiert bei verschiedenen NAD-Konzentrationen.
NAD-Konz.: (-●-) 2 mM; (-■-) 3 mM; (-◆-) 4 mM; (-▲-) 6 mM.

Für die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der untersuchten Enzymlösungen ergab sich ein Wert von 113 µMol/min · mg für die DHAP-Reduktion und von 15,5 µMol/min · mg für die G-3-P-Oxidation. Dabei war es gleichgültig, ob die Werte aus den Meßserien für die Substrat- oder Coenzym-Variation ermittelt wurden. Dies spricht für eine gute Übereinstimmung der Messungen.

3.20. Bestimmung von Inhibitorkonstanten

3.20.1. Hemmung durch AMP

Die Hemmung durch AMP zeigte bei der Variation der NADH-Konzentration (2.2.22.) den Typ der kompetitiven Hemmung, wobei sich allerdings bei höheren NADH-Konzentrationen Abweichungen von der Linearität zeigten (Abb. 15b). Bei Variation von DHAP ergab sich der Typ der nichtkompetitiven Hemmung (Abb. 15a). Diese Hemmtypen waren, abgesehen von der Abweichung von der Linearität in Abb. 15b, auf Grund der Strukturanalogie von AMP und NADH zu erwarten. Die Inhibitorkonstanten von AMP wurden zu 3,8 mM bei NADH-Variation und zu 10 mM bei DHAP-Variation bestimmt.

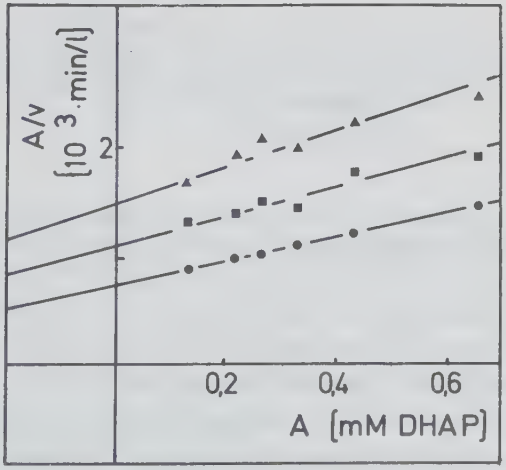


Abb. 15a: Hemmung der GPDH durch AMP in Abhängigkeit der DHAP-Konzentration; HANES-Diagramm.
AMP-Konz.: (-■-) 5 mM; (-▲-) 10 mM. (-●-) ungehemmte Reaktion.

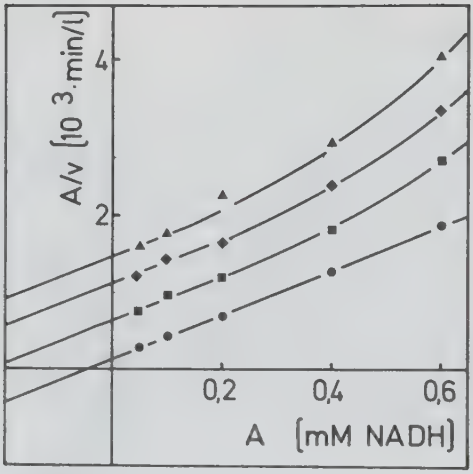


Abb. 15b: Hemmung der GPDH durch AMP in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration; HANES-Diagramm. AMP-Konz.: (-■-) 9 mM; (-◆-) 18 mM; (-▲-) 27 mM. (-●-) ungehemmte Reaktion.

3.20.2. Hemmung durch ATP

Sämtliche Auftragungen der Hemmung durch ATP (2.2.22.) ergaben nichtlineare Plots, sowohl bei Variation von NADH wie auch von DHAP. Bei der Auftragung nach DIXON (1/v gegen I) zeigte sich jedoch ein Charakteristikum der ATP-Wirkung (Abb. 16). Bei niedriger Inhibitorkonzentration erfolgte zunächst eine Erhöhung der Enzymaktivität, die umso stärker ist, je geringer die Substratkonzentration ist. Erst im Bereich von ATP >1 mM ist dieser Effekt rückläufig und schlägt in eine Hemmung um. Asymptoten an die gekrümmten Hemmkurven ergaben einen Schnittpunkt unterhalb der x-Achse. Die Hemmkurven können also nicht durch Überlagerung einer Aktivierung auf eine lineare Hemmung entstanden sein. Es muß daher ein komplizierterer Hemmtyp zugrunde liegen. Hemmkonstanten konnten aus diesem Grunde für ATP nicht ermittelt werden.

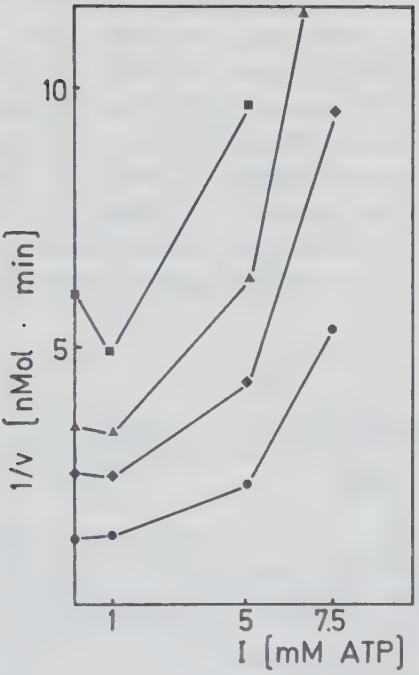


Abb. 16: Hemmung der GPDH durch ATP in Abhängigkeit von der DHAP-Konzentration; DIXON-Diagramm. DHAP-Konz.: (-●-) 1,2 mM; (-◆-) 0,6 mM; (-▲-) 0,3 mM; (-■-) 0,15 mM.

3.20.3. Hemmung durch Phosphat

Die Inhibitorkonstanten von Phosphat waren relativ niedrig; sie betrugen bei Variation von DHAP 1 mM und bei der Rückreaktion 0,4 mM bei Variation von G-3-P. Die Rückreaktion wird also durch Phosphat stärker gehemmt als die Hinreaktion.

Bei Variation der NADH-Konzentration zeigte die doppelt reziproke Auftragung (Lineweaver-Burk-Diagramm) eine kompetitive Hemmung; das Sekundärdiagramm (Steigung gegen Inhibi-

torkonzentration) war jedoch nicht linear. Dies ließ zunächst auf einen "partiell kompetitiven" Hemmtyp schließen. Die Auftragung der Meßdaten nach HANES (Abb. 17b) ergab bei höheren NADH-Konzentrationen ebenfalls das Bild einer "partiell kompetitiven" Hemmung (eine Parallelenschar mit nichtlinearem Sekundärdiagramm y/ I), bei niedrigen NADH-Konzentrationen ist jedoch bei den Meßdaten mit Inhibitor (P_i) ein Abweichen von der Linearität festzustellen, während die ungehemmte Reaktion linear ist. Diese Abweichung zeigt an, daß in diesem Bereich ein komplizierterer Hemmtyp überlagert ist.

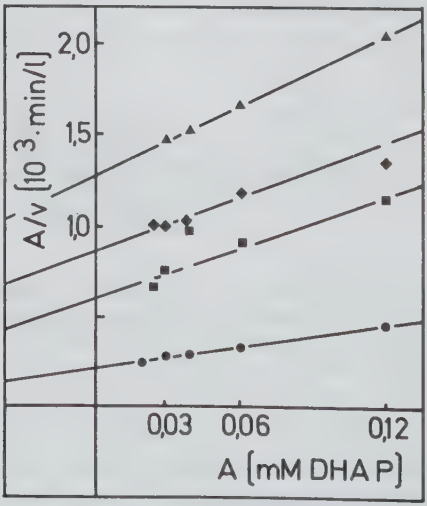


Abb. 17a: Hemmung der GPDH durch Phosphat in Abhängigkeit von der DHAP-Konzentration; HANES-Diagramm. PO_4-Konz.: (-■-) 2 mM; (-◆-) 3 mM; (-▲-) 6 mM. (-●-) ungehemmte Reaktion.

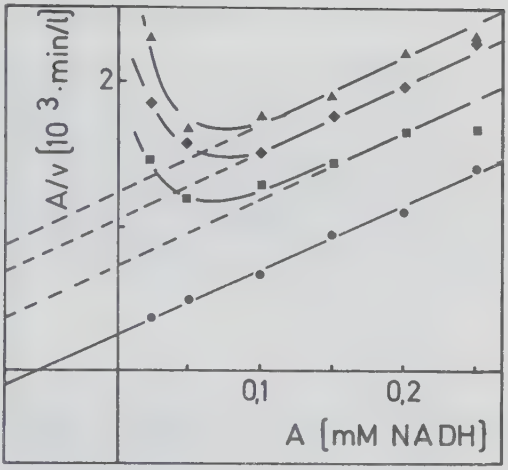


Abb. 17b: Hemmung der GPDH durch Phosphat in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration; HANES-Diagramm. PO_4-Konz.: (-■-) 3 mM; (-◆-) 6 mM; (-▲-) 9 mM. (-●-) ungehemmte Reaktion.

3.20.4. Einfluß von Fructose-Bisphosphat auf die GPDH-Aktivität

Die Oxidation von G-3-P wurde durch FBP im gleichen Maße gehemmt wie durch Phosphat. Die Reduktion von DHAP wurde dagegen durch FBP beschleunigt. Im HANES-Diagramm ergab sich bei Variation der NADH-Konzentration eine Parallelenschar (Abb. 18). Entsprechend einer Aktivierung liegen dabei jedoch die Geraden mit FBP-Zusatz unterhalb der Geraden der unbeeinflußten Reaktion. Das Sekundärdiagramm y/ FBP ergibt wie bei der partiell kompetitiven Hemmung keine Gerade.

Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch einen potentiellen Hemmstoff kann bei der partiell kompetitiven Hemmung theoretisch folgendermaßen erklärt werden:

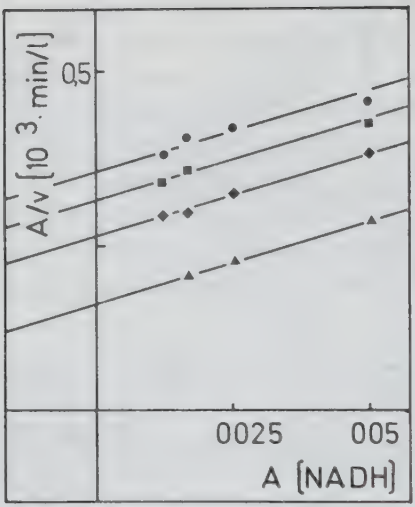


Abb. 18: Einfluß von FBP auf die GPDH-Aktivität in Abhängigkeit von der NADH-Konzentration.
FBP-Konzentrationen: (-■-) 2 mM; (-◆-) 5 mM; (-▲-) 10 mM. (-●-) Reaktion ohne FBP.
Bei Variation der DHAP-Konzentration ergeben sich entsprechende Diagramme.

Ist in diesem Fall K_i größer als K_{ii}, ergibt sich bei gleichen Zerfallsraten von EA → E + P und EAI → Ei + P eine Aktivierung des Enzyms, weil EA aus dem Gleichgewicht entfernt wird:

$$\begin{array}{ccc} E & \rightleftharpoons & EA \longrightarrow E + P \\ k_i \Big\downarrow & & \Big\Vert\, k_{ii} \\ EI & \rightleftharpoons & EAI \longrightarrow EI + P \end{array}$$

3.21. Abhängigkeit der GPDH-Aktivität vom pH und von der Art der Puffersubstanzen

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Enzyms wurde auf verschiedene Puffersysteme ausgedehnt. Dabei ergaben sich in allen untersuchten Puffersystemen Aktivitätskurven mit relativ geringen Unterschieden im Bereich zwischen pH 6 und 7,5; also in einem weiten pH-Bereich. Allerdings wurden bei den Absolutwerten der Enzymaktivität große Unterschiede zwischen den verschiedenen Puffersystemen gefunden (Abb. 19a und b).

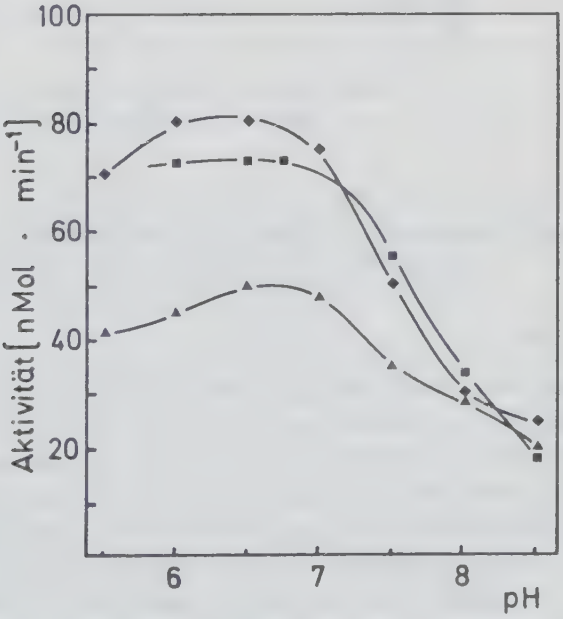


Abb. 19a: pH-Abhängigkeit der GPDH-Aktivität in verschiedenen Puffern. 100 mM TRIS-Base, titriert mit HCl (-■-), Essigsäure (-▲-) und DL-Äpfelsäure (-◆-).

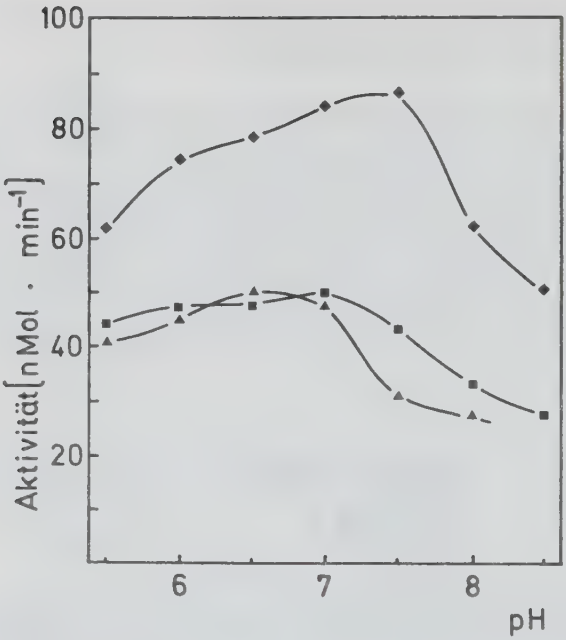


Abb. 19b: pH-Abhängigkeit der GPDH-Aktivität in verschiedenen Puffern. 100 mM HCl (-■-), Essigsäure (-▲-) und DL-Äpfelsäure (-◆-), titriert mit TRIS-Base.

Die durchweg niedrigste Enzymaktivität wurde im System TRIS/Acetat bzw. Acetat/TRIS gefunden, die höchste im System Malat/TRIS bzw. TRIS/Malat. Dabei ist anzumerken, daß die Salzkonzentration im Malat/TRIS-Puffer höher ist als im TRIS/Malat-System, da zur Titration des zweibasigen Malats mehr TRIS benötigt wurde. Das eigentliche pH-Optimum erwies sich als variabel und ebenfalls abhängig vom Puffersystem und entsprechend von der "Salzkonzentration" des Puffers, wie der Vergleich der Kurven für TRIS/Malat und MALAT/TRIS zeigt.

3.22. Einfluß der Pufferkomponenten, Pufferkonzentration und Salzkonzentration auf die Enzymaktivität

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuche sind in den Tabellen 11 - 13 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Aktivität der GPDH aus *Dunaliella* tert. (in U/ml) in verschiedenen Puffersystemen bei pH 6,8

Puffer-System	50 mM	100 mM	200 mM
TRIS/HCl	0,031	0,052	0,061
TRAP/HCl	0,04	0,058	
TRIS/H_2SO_4	0,025	0,041	
Malat/KOH	0,047	0,124	0,132

Tabelle 12: Aktivität der GPDH aus *Dunaliella* tert. (in U/ml) in verschiedenen Puffersystemen bei pH 6,8

Puffer-System	40 mM	200 mM
Malat/KOH	0,038	0,086
Succinat/KOH	0,038	0,092
Fumarat/KOH	0,035	0,094
Aspartat/KOH	0,030	0,073
Glutamat/KOH	0,038	0,086

Tabelle 13: Aktivität der GPDH aus *Dunaliella* tert. in 100 mM TRIS/HCl pH 6,8; mit verschiedenen Salzzusätzen. Die Aktivität ist in % der Kontrolle ohne Salzzusatz angegeben.

Salzzusatz	---	10 mM	100 mM	200 mM	400 mM
KCl	100	116	179	158	112
NaCl	100		183		
KNO_3	100		187		
$NaNO_3$	100		208		

Die niedrige Enzymaktivität im System TRIS/SO_4 ist dabei eher auf einen Effekt der Salzkonzentration als auf einen speziellen Anioneffekt zurückzuführen.

Die hohe Aktivität im System Malat/KOH ist sicher zum Teil auf die höhere Salzkonzentration zurückzuführen. Aus der Abb. 19a ist jedoch ersichtlich, daß offenbar zusätzlich auch das Anion eine Rolle spielt. Der pH-Bereich um 7 liegt weit genug vom 2. pK des Malats (5,11) entfernt, als daß durch die Pufferwirkung große Konzentrationsunterschiede im Vergleich mit dem System TRIS/HCl hervorgerufen werden können.

Tabelle 12 zeigt, daß die unterschiedlichsten zweibasigen Anionen nahezu gleichartige Effekte hervorbringen.

Tabelle 13 zeigt ein Ansteigen der Enzymaktivität mit steigender Salzkonzentration (TRIS/HCl + NaCl) bis 200 mM und dann einen langsamen Abfall. Die Aktivität bei 400 mM Salz ist jedoch immer noch höher als der Ausgangswert bei 100 mM. Im Zusammenhang mit den Werten des Systems Malat/KOH in Tabelle 10 zeigt sich, daß diese Aktivierung ein Salzeffekt ist und nicht ein Effekt der Ionenstärke. In allen Systemen wurde die höchste Enzymaktivität bei einer Anionenkonzentration von 200 mM gemessen. Diese entspricht im System Malat/KOH einer Ionenstärke von 0,5 ($I = \frac{1}{2} \Sigma C_i \cdot Z_i^2$), während sie

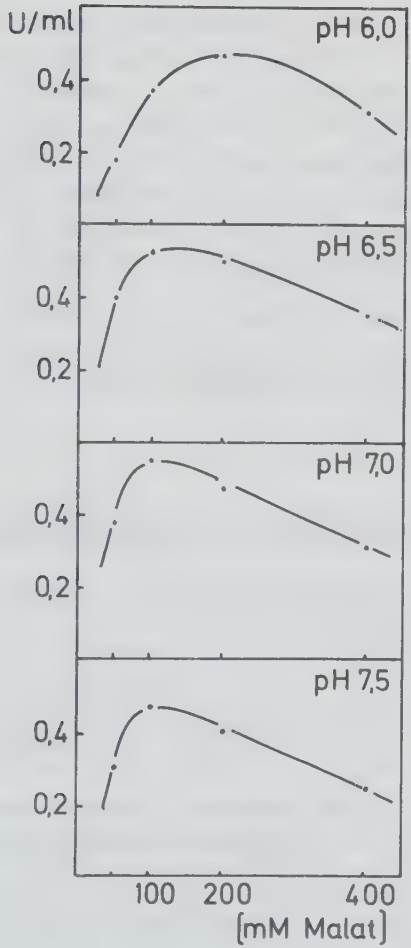


Abb. 20: Abhängigkeit der GPDH-Aktivität von der Salzkonzentration. Zur Einstellung des Puffers wurde DL-Äpfelsäure-Lösung der angegebenen Konzentration mit TRIS-Base titriert.

in den Systemen mit einwertigen Anionen einer Ionenstärke von 0,2 (in diesem Fall identisch mit der Konzentration) entspricht.

Es besteht stets eine gegenseitige Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert in allen verwendeten Systemen. Abbildung 20 zeigt die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Molarität des Malat/TRIS-Puffers. Diese Aktivitätskurve verändert sich mit dem pH des Puffersystems, da durch die Titration der Äpfelsäure bei steigendem pH-Wert immer größere Mengen TRIS zugesetzt werden. Damit entspricht die für die vorgelegte Substanz (Malat) angegebene Molarität nicht mehr der tatsächlich vorliegenden Salzkonzentration.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß eine Erhöhung der Salzkonzentration im Bereich bis ca. 200 mM eine deutliche Aktivierung des Enzyms bewirkt.

3.23. Einfluß von Mannit auf die Aktivität der GPDH

Die Ergebnisse des Versuchs 2.2.23.7. sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14: Einfluß von Mannit auf die Aktivität der GPDH

Test	Endkonz. Puffer	Endkonz. Mannit	Gesamtkonz.	% Aktivität
a	35 mM	---	35 mM	100
b	42 mM	---	42 mM	128
c	35 mM	135 mM	170 mM	120

Durch die Erhöhung der Pufferkonzentration von 35 mM auf 42 mM wurde eine Steigerung der GPDH-Aktivität um ca. 30 %

erreicht. Mit dem Zusatz von 135 mM Mannit wird dagegen nur eine Steigerung um 20 % erreicht. Der Einfluß von Salzen auf die GPDH-Aktivität ist daher um ein Vielfaches größer als der Einfluß nichtionischer, osmotisch aktiver Substanzen.

3.24. Einfluß von Trifluoperazin und EGTA auf die Glycerinsynthese in *Dunaliella*

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tabelle 15: Einfluß von Trifluoperazin und EGTA auf die Glycerinsynthese in *Dunaliella*

Glyceringehalt (mg/ml Suspension) nach	0 min	20 min	60 min
Kontrolle	0,769	0,894	1,123
EGTA $1o^{-3}$	0,785	0,91	1,016
EGTA 10^{-2}	0,751	0,851	0,953
Trifluoperazin		0,89	1,079

Die Verdünnung der Algensuspension beim osmotischen Sprung ist bei der Berechnung berücksichtigt.

Die Tabelle zeigt, daß die im Versuch eingesetzten Calmodulin-Antagonisten die Glycerinbildung in *Dunaliella* unter osmotischer Belastung nur teilweise unterdrücken.

3.25. Einfluß von Trifluoperazin auf die $^{14}CO_2$-Fixierung unter osmotischer Belastung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tabelle 16: Einfluß von Trifluoperazin auf die $^{14}CO_2$-Fixierung unter osmotischer Belastung.

Probe	Gesamtfixierung (DPM/mg Chlorophyll)
unbelastete Kontrolle	$1044 \cdot 10^3$
Kontrolle mit osmotischer Belastung	$3052 \cdot 10^3$
Algensuspension mit Trifluoperazin, mit osmotischer Belastung	$848 \cdot 10^3$

Die Tabelle zeigt, daß die Gesamtfixierung bei Zusatz von Trifluoperazin drastisch erniedrigt ist. Obwohl die Probe osmotisch belastet war, liegt der Wert für den $^{14}CO_2$-Einbau unter dem der unbelasteten, unbehandelten Kontrolle. Dies ist umso bemerkenswerter, als gerade Trifluoperazin auf die Glycerinsynthese nur einen sehr geringen Einfluß hat (siehe 3.25.).

4. DISKUSSION

Die Grünalge *Dunaliella* erscheint wegen ihres großen Regelbereichs als Untersuchungsobjekt für die Regulationsmechanismen der Osmoregulation besonders geeignet. Einige mögliche biochemische Mechanismen konnten bei diesem Organismus zunächst ausgeschlossen werden:

Eine de novo Enzymsynthese scheidet auf Grund der sehr schnellen Reaktion aus. Bereits 1 Minute nach osmotischer Belastung wird in Versuchen mit $^{14}CO_2$ ein sehr starker Anstieg des markierten Glycerins im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle gefunden (WEGMANN 1968, 1969).

Ein direkter Einfluß des als Osmotikum verwendeten und im natürlichen Habitat der Alge wirkenden NaCl scheidet ebenfalls aus, da es sich, wie schon in der Einleitung erwähnt, bei *Dunaliella* nicht um eine Salzregulation, sondern um eine echte Osmoregulation handelt. Auch zeigen die Untersuchungen von WEGMANN et al. (in Vorbereitung), daß NaCl nicht in verstärktem Maße in die Zelle aufgenommen wird: Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenanalytik an *Dunaliella*-Dünnschnitten konnte gezeigt werden, daß die Na^+-Konzentration im Inneren der Dunaliella-Zelle auch bei hoher Salzbelastung im Medium (3 M ≙ 18 % NaCl) 100 mM nicht übersteigt (K. WEGMANN, M.F. WENDT-GALLITELLI, H. WOLBURG, in Vorbereitung).

Offenbar handelt es sich auch nicht um einen Ca^{2+}-abhängigen Prozeß wie z.B. bei *Poterioochromonas* (KAUSS 1983), da mit den Calmodulin-Inhibitoren Trifluoperazin und EGTA bei *Dunaliella* zwar die ^{14}C-Inkorporation über die Photosynthese, nicht aber die Glycerinakkumulation als solche unter osmotischer Belastung verhindert wird (siehe 3.24. und 3.25.). Die in diesem Versuch festgestellte Verringerung der Gesamtfixierungsrate von $^{14}CO_2$ wie auch die dadurch bedingte Verringerung der Einbaurate von ^{14}C in Glycerin in den mit Ca^{2+}-Chelatoren behandelten Ansätzen gegenüber der Kontrolle ist sicherlich im wesentlichen auf die Tatsache zurückzuführen,

bei solche Substanzen das Photosystem II inhibieren (BARR, 1982). Vermutlich werden durch das Fehlen der Ca^{2+}-Ionen membranstrukturen, die für die Photosynthese wichtig sind, labilisiert.

Eine andere Möglichkeit der Osmoregulation mußte jedoch in Betracht gezogen werden: durch den Wasserentzug bei osmotischer Belastung werden alle in der Protoplasten-Zelle gelösten Salze und Metabolite konzentriert. Eine dadurch hervorgerufene Konzentrationsveränderung von Enzym-Effektoren könnte durchaus ein Auslöser für Umsteuerungen im Stoffwechsel sein.

Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, die Einflüsse möglicher regulierender Metabolite auf die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase zu untersuchen, da dieses Enzym mit großer Wahrscheinlichkeit im Mechanismus der Osmoregulation eine ausschlaggebende Rolle spielt.

Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Reinigung des Enzyms. Ein erster vielversprechender Ansatz zur Reinigung der GPDH aus Protoplasten [illegible] wurde von WEINS (1978) unternommen: mit einer ligandenspezifischen Affinitäts-Säule konnte eine 37-fache Anreicherung des Enzyms erzielt werden. Diese Reinigungsmethode konnte zur Durchführung der vorliegenden Arbeit allerdings aus zwei wesentlichen Gründen nicht angewandt werden:

I. Die ebenfalls im Rohextrakt in hoher Aktivität enthaltene Glycerin-3-Phosphatase dephosphorylierte den an das Gel gekoppelten Liganden, so daß die Bindungskapazität verloren ging (WEINS, 1978).

II. Die erzielte Volumenaktivität war zu gering. Für enzymkinetische Messungen und insbesondere Messungen mit Inhibitoren konnte das gereinigte Enzym ohne vorherige Konzentrierung nicht eingesetzt werden. Die Konzentrierung der gereinigten GPDH erwies sich aber schon in den Untersuchungen von WEINS als problematisch, da Fällungen mit organischen Lösungsmitteln wie auch Aussalzversuche das Enzym inaktivierten (WEINS, 1978). Dialysemethoden kön-

nen bei dem instabilen Enzym nicht angewandt werden, da sie zuviel Zeit beanspruchen.

Der von WEINS durchgeführte Aufschluß der Algenzellen im BÜHLER-Homogenator dauerte ca. 1/2 h. Es wurde daher nach einer ebenso wirkungsvollen, aber erheblich schnelleren Methode gesucht. Der Aufschluß der Zellen mit Glasperlen im Znetrifugenglas konnte in 5 Minuten durchgeführt werden (3.11.). Er ergab im TRIS- wie auch im Triethanolamin-Puffer praktisch gleiche Ergebnisse. Im Phosphatpuffer werden dagegen anscheinend Membranstrukturen stabilisiert, da die Chlorophyllkonzentration im Rohextrakt wesentlich geringer war als in den anderen Puffersystemen. Die Aktivität der GPDH im Rohextrakt war beim Aufschluß der Zellen in Phosphatpuffer, bezogen auf den Chlorophyllgehalt des Rohextraktes, überproportional geringer. Dies ist auf eine Hemmung des Enzyms durch Phosphat zurückzuführen: ein Zusatz von 10 mM Phosphat zum Standardtest mit G-3-P als Substrat (2.2.5.1.) erniedrigte die Enzymaktivität erheblich. Sie beträgt nur ca. 1/3 der Aktivität im TRIS-Puffer ohne P_i.

Da der Aufschluß mit Glasperlen das umständliche und zeitraubende Abtrennen und Auswaschen der Glasperlen erforderlich machte, wurde zum Aufschluß durch Ultraschall übergegangen. Diese Methode erschien den Angaben von WEINS (1978) zufolge zunächst unpraktikabel. Die hier vorgelegten Ergebnisse (3.1.2.) zeigen jedoch, daß die Behandlungszeit viel zu lang gewählt worden war (10 x 30 sec mit 30 sec Pause). Der Rückgang in der Aktivität der GPDH bei längerer Ultraschallbehandlung kann durch Erwärmung des Rohextrakts wie auch durch die Einwirkung von Scherkräften auf das relativ große Enzymmolekül (MG 200 000; WEINS, 1978) verursacht werden. Die beim Zellaufschluß mit 3 Ultraschallpulsen von 5 sec erhaltene Volumenaktivität der GPDH im Rohextrakt liegt weit über den Werten, die mit dem BÜHLER-Homogenator erreicht wurden; ebenso die Werte der spezifischen Aktivität.

Das größte Problem bei der Ausarbeitung einer Enzymreinigung war die große Instabilität der GPDH. So konnten mit ein und

demselben Rohextrakt in der Regel nicht mehrere Versuche durchgeführt werden. Vielmehr war für jeden Versuch eine neue Anzucht und Homogenisation der Algen notwendig, was naturgemäß stets zu unterschiedlichen Rohextrakten bezüglich Gesamtproteingehalt, spezifischer Aktivität und auch Stabilität der GPDH führte. Dadurch wurde die Beurteilung der Reproduzierbarkeit gleicher Versuche wie auch der Vergleich verschiedener Methoden stark erschwert.

Wie auch schon bei den Untersuchungen von WEINS (1978), war es jedoch nicht möglich, die GPDH im Rohextrakt wie auch bei nachfolgenden Reinigungsschritten durch Pufferzusätze in befriedigender Weise zu stabilisieren. Osmotisch wirksame Substanzen, zumindest Glycerin, sollten nach den Versuchen von WEINS (1978) einen positiven Effekt auf die Stabilität der GPDH haben. Dieser Befund konnte jedoch nicht bestätigt werden (3.2.1.).

Nach BERNFELD et al. (1965) sind Polyanionen wie BSA und Nucleinsäuren in der Lage, Enzyme, besonders bei hoher Verdünnung, zu stabilisieren. Dies traf jedoch für die GPDH, zumindest was den Zusatz von Nucleinsäuren betrifft, nicht zu (3.1.1.). Durch Zusatz von BSA war in einigen Versuchen eine Stabilisierung (3.9.4. und 3.17.) und z.T. sogar eine Reaktivierung (3.1.2.) zu beobachten.

Für Zusatz von großen Mengen BSA war jedoch für die Reinigung des Enzyms aus methodischen Überlegungen, wie auch wegen der Probleme bei der Auswertung der Reinigungsfaktoren, nicht sinnvoll (3.1.2.).

Die Beeinflussung der Enzymaktivität durch Licht konnte in der vorliegenden Arbeit nicht befriedigend abgeklärt werden. Zwar wurde unter bestimmten Bedingungen eine im Vergleich zur Dunkelkontrolle stärkere Aktivitätsabnahme im Rohextrakt beobachtet (Tab. 4), die genauere Untersuchung bei Belichtung mit definierten Wellenlängen ergab jedoch im Gegensatz dazu keine Anhaltspunkte für eine belichtungsabhängige Inaktivierung. Absorptionsspektren von Enzymlösungen, die aus verschiedenen Isolierungen stammten, zeigten sehr unter-

schiedliche Lagen und relative Höhen der Maxima (Abb. 3). Dies deutet darauf hin, daß in den verwendeten Enzymlösungen aus der DEAE-Ionenaustauschchromatographie Pigmentreste aus dem Rohextrakt in unterschiedlicher Menge und Verteilung vorhanden waren. Diese Pigmente könnten in den beobachteten Fällen als Energieverstärker wirken. Die Photoinaktivierung wäre somit keine Eigenschaft der GPDH selbst. Es ist auch kaum anzunehmen, daß eine Photoinaktivierung des Enzyms, zumindest was den Mechanismus der Osmoregulation betrifft, eine physiologische Rolle spielt.

Da bei der Affinitätschromatographie an Glycerinphosphat-Sepharose nach WEINS (1978) das Säulenmaterial nur einmal verwendet werden konnte (s.o.), wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst versucht, die GPDH durch Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose zu reinigen. Das AMP nimmt dabei die Rolle eines NAD-Analogen ein. Beim Auftrag eines Rohextrakts in 100 mM TRIS-Isolationspuffer erfolgte jedoch keine zufriedenstellende Bindung des GPDH an das Säulenmaterial. Die Enzymaktivität eluierte beim Auftragen am Ende des Durchlaufvolumens (Abb. 4d). Beim Auftrag in 100 mM Phosphat-Isolationspuffer wurde das Enzym jedoch gebunden. Das Auftragen des Rohextrakts in 100 mM Phosphatpuffer, gefolgt von einer Elution mit TRIS-Puffer, erschien zunächst vielversprechend; schon aus dem Grunde, daß das Eluat keine Substanzen enthält, die für die Kinetik-Experimente entfernt werden müssen (Abb. 4a). Auch die Ausbeute von 78 % erschien zunächst akzeptabel. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß die Ausgangsaktivität im Rohextrakt durch den Phosphatpuffer auf ca. 30 % reduziert wurde. Daraus resultierte eine de-facto Ausbeute von nur 26 %. Es war auch nicht auszuschließen, daß im Eluat in den enzymhaltigen Fraktionen noch Reste von Phosphatpuffer vorlagen. Darauf deuteten auch Ergebnisse hin, die im Enzymtest erhalten wurden: eine Verringerung der eingesetzten Enzymlösung im Test ergab eine scheinbare Erhöhung der Volumenaktivität.

Da die Hemmung der GPDH durch Phosphat anfänglich auf eine Kompetition an der Bindungsstelle für Glycerin-3-Phosphat

zurückgeführt wurde, wurde versucht, den Rohextrakt in TRIS-Isolationspuffer + 50 mM G-3-P auf die AMP-Sepharose aufzutragen. Unter diesen Bedingungen wurde die GPDH ebenfalls auf der Säule gebunden und konnte durch TRIS-Isolationspuffer ohne G-3-P wieder eluiert werden (Abb. 4e). Aber auch in diesem System waren Ausbeute und Volumenaktivität sehr niedrig.

Nach mehrfacher Verwendung der AMP-Sepharose ließen sich jedoch weder diese Versuche noch die Versuche mit dem System Phosphatpuffer/TRIS-Puffer reproduzieren. Erst durch den Einsatz frischer AMP-Sepharose konnten die vorherigen Ergebnisse wieder erzielt werden. Eine Phosphatbestimmung am Säulenmaterial (3.4.) bestätigte die Vermutung, daß die AMP-Sepharose, ebenso wie auch die Glycerinphosphat-Sepharose, durch eine 5'-Nucleotidase hydrolysiert wurde. Sowohl die von HEPPEL und HILMOE (1955) beschriebene 5'-Nucleotidase wie auch unspezifische alkalische Phosphatasen sollten sich durch Komplexbildner (Abfangen des für die Reaktion notwendigen Mg^{2+}) hemmen lassen. Da jedoch nur eine teilweise Hemmung resultiert (Boehringer biochemica information), und auch mit NaF nur eine teilweise Hemmung möglich war, wurde eine Kombination von NaF und Na-Silikat zur vollständigen Hemmung der Nucleotidase im Rohextrakt eingesetzt. Eine Hemmung der GPDH wurde dadurch nicht beobachtet. Mit diesen Zusätzen zum Rohextrakt war allerdings eine Bindung der GPDH an die AMP-Sepharose nicht mehr möglich. Die Ursache ist vermutlich die starke Erhöhung der Ionenstärke im Rohextrakt durch die Zusätze. Da auch eine Abtrennung der Nucleotidase durch Gelfiltration nicht den gewünschten Erfolg brachte (3.3.6.), mußte auf eine Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose, zumindest aus dem Rohextrakt, verzichtet werden.

Die Anwesenheit der Nucleotidase-Aktivität im Rohextrakt wirft auch ein völlig neues Licht auf die Ergebnisse von WEINS (1978). Er fand bei der Aktivitätsanfärbung der GPDH in Polyacrylamidgelen eine aktive Bande mit NAD wie auch mit dem, normalerweise nicht als Coenzym akzeptierten, NADP (WEINS, 1978). Bei einer aus Kartoffeln isolierten Nucleo-

tidase (HEPPEL und HILMOE, 1955) wird auch eine merkliche Aktivität gegenüber 2'-Nucleotiden beschrieben. Bei der im Vergleich zum Aktivitätstest langen Zeit bei der Aktivitätsanfärbung könnte daher die Hydrolyse von NADP zu NAD durch eine Nucleotidase durchaus eine Rolle spielen. Auch das bisher noch nirgends diskutierte Faktum, daß die GPDH aus *Dunaliella* zwar NAD-spezifisch ist, aber offenbar im Chloroplasten lokalisiert ist (BROWN et al., 1982), könnte damit eine Erklärung finden.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit AMP-Sepharose warfen die Frage auf, ob Phosphat als Inhibitor der GPDH eine Rolle in der Regulation des Algenstoffwechsels spielt. Die hohe Phosphatkonzentration im Zellinneren im Vergleich zum Außenmedium (3.7.2.) ist auf eine sehr rasche Aufnahme von Phosphat entgegen dem Konzentrationsgefälle zurückzuführen. Selbst bei relativ kurzen Waschprozeduren wird Phosphat fast vollständig aus dem Medium in die Algenzellen aufgenommen (3.7.2.c).

Die Ergebnisse der Phosphatbestimmungen sind, gerade auch bei den osmotisch belasteten Algenproben, nicht leicht zu interpretieren. Obwohl zunächst auffällt, daß die Konzentration von Phosphat in Algen aus Medien höheren Salzgehaltes geringer ist, so zeigt sich bei genauer Betrachtung, daß dieses Ergebnis auch auf eine langsamere Aufnahme des Phosphats aus dem Medium zurückgeführt werden kann (vgl. die Werte der Überstände in 3.7.2.c). Ein weiterer Tatbestand erschwert die Beurteilung: die Phosphatkonzentrationen in den Algen aus 2 %, 6 % und 10 % verhalten sich nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, wie eine absteigende Reihe. Die Phosphatkonzentration der 6 %-Algen liegt weit unter der der 10 %-Algen (3.7.2.a). Aus Tabelle 6 geht hervor, daß die Algenmenge in dieser Suspension um ca. 40 % höher war als bei 2 % bzw. 10 % NaCl. Das Wachstumsoptimum der Algen liegt bei 6 % NaCl im Medium. Die hohe Zelldichte liefert eine Erklärung für die niedrige Phosphatkonzentration in den Zellen: Die Algenzellen nehmen beim Umsetzen auf frisches Medium sehr schnell fast alles Phosphat auf. Bei der Zelltei-

lung muß es auf beide Tochterzellen aufgeteilt werden, ohne daß es aus dem Medium nachgeliefert werden kann. Die steigende Zelldichte hat daher ein Absinken des Phosphatgehalts der Zellen zur Folge. Rechnet man die Phosphatkonzentration der 6 %-Algen auf ein "wet packed volume" von 1,4 ml um, was den Werten der anderen Suspensionen entspricht, so ergibt sich eine Phosphatkonzentration von 1,3 mM. Dieser Wert paßt in die Reihe von 1,4 mM bei 2 % NaCl und 1,26 mM bei 10 % NaCl (Tabelle 6).

Obwohl durch diese Berechnung eine Korrelation des Phosphatgehalts mit der Salzkonzentration sichtbar ist, ist es die Frage, inwieweit die Phosphatgehalte der Algen nicht auch eine gewisse Reproduzierbarkeit der Kulturbedingungen repräsentieren. Die Unterschiede in den Phosphatkonzentrationen der Algen aus verschiedenen Medien mit vergleichbarer Zelldichte könnten nämlich durchaus von der Tatsache herrühren, daß die osmotisch stärker belasteten Algenzellen das Phosphat aus dem Medium langsamer aufnehmen (vgl. 3.7.2.c, Werte $6\ddot{U}_1$-$10\ddot{U}_1$). Dadurch könnten die Algen in niedrigeren NaCl-Medien durch das Waschen während des Überimpfens einen Vorsprung im Phosphatgehalt aufrechterhalten.

Die Messungen der Phosphatkonzentration in den Algenzellen erbrachten eine wesentliche Erkenntnis: Vergleicht man die Ergebnisse der 6 %-Algen in den verschiedenen Versuchen, so zeigt sich, daß unter gleichartigen physiologischen Bedingungen (gleicher Salzgehalt, ohne Be- oder Entlastung) große Unterschiede in den Phosphatkonzentrationen in den Algenzellen auftreten können, ohne daß dadurch die Fähigkeit zur Osmoregulation beeinflußt wird.

Nach dem Scheitern der Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose wurde versucht, die GPDH durch Ionenaustauschchromatographie zu reinigen. Ionenaustauscher sind zwar nicht so spezifisch wie gruppen- oder ligandenspezifische Affinitätsgele; es kann jedoch auch hier mit guten Anreicherungen gerechnet werden, wenn geeignete Optimalbedingungen erarbeitet werden können.

Die Bindung und Desorption der GPDH an DEAE-Servacel und DEAE-Sephadex A-25 war weitgehend gleich. Bezüglich der Laufeigenschaften war der Sephadex-Austauscher jedoch der DEAE-Cellulose weit überlegen. Bei der Cellulose konnten, trotz sorgfältigstem Aufschlämmen des Austauschers und Packen der Säule, Zacken und Spitzen an der Auftragsfront, die Inhomogenitäten des Säulenflusses anzeigten, nie vermieden werden.

Die Gradientenelution mit NaCl war zur Isolierung der GPDH nicht geeignet, da sie entweder mit geringen Ausbeuten oder mit einem hohen Anteil an Fremdprotein in den aktiven Fraktionen verlief. Sie ließ sich aber zur Bestimmung der, zur Desorption des GPDH nötigen, Salzkonzentration auswerten. Die Kenntnis dieser Konzentration machte eine Stufenelution der GPDH vom Austauscher möglich. Mit dieser Methode konnte die Verweildauer des Enzyms auf der Säule erheblich verkürzt werden, da Waschen und Vorelution von Fremdprotein in einem Schritt bei niedrigerer Salzkonzentration vorgenommen werden konnten. Dennoch konnte mit dieser Methode nur eine Ausbeute von 38 % erzielt werden. Die Enzymaktivität konnte nur durch Zusatz von 500 µg/ml Rinderserumalbumin im Wasch- wie auch im Elutionspuffer aufrechterhalten werden.

Obwohl die Reinigung über DEAE-Ionenaustauscher im Prinzip akzeptable Ergebnisse gebracht hatte, war sie aus mehreren Gründen für eine routinemäßige Reinigung der GPDH nicht einsetzbar:

Erstens war die Kapazität des Austauschers für eine Reinigung aus dem Rohextrakt zu gering; es wären sehr große Bettvolumina zur Reinigung der erforderlichen Enzymmenge notwendig gewesen.

Zweitens wären in jedem Fall, speziell beim Zusatz von BSA zum Puffer, weitere spezifische Reinigungsschritte notwendig gewesen. Aber auch mit den Eluaten der DEAE-Säulen konnte keine reproduzierbare Bindung des Enzyms an AMP-Sepharose erreicht werden.

Drittens war das erforderliche Auswaschen der zurückgebliebenen Pigmente vom Säulenmaterial mit Ethanol sehr zeitrau-

bend, da es wegen des Schrumpfens des Gels nicht in der Säule durchgeführt werden konnte.

Die starke Hemmung des Enzyms durch Phosphat legte die Vermutung nahe, daß die GPDH an Hydroxyapatit adsorbiert werden könnte. Vorversuche zur Hemmung des Enzyms durch Phosphat im Rohextrakt und im Eluat der AMP-Säule ließen auf einen kompetitiven Hemmtyp schließen. Damit wäre eventuell eine spezifische Desorption durch G-3-P möglich gewesen, bei gleichzeitiger Stabilisierung des Enzyms.

Die Ergebnisse zeigen aber, daß eine spezifische Desorption mit G-3-P nicht durchgeführt werden konnte (Abb. 7 und 8). Es fand noch nicht einmal eine spezifische Adsorption der GPDH an Hydroxyapatit statt; vielmehr wurden die Proteine aus dem Rohextrakt quantitativ auf der Säule gebunden.

Ein Versuch, das Enzym an frisch gefälltes Calciumphosphat zu adsorbieren, gelang nicht.

Der entscheidende Schritt zur Isolierung der GPDH gelang im Prinzip durch die Verwendung von Blausepharose. Obwohl zunächst nach Vorversuchen eine Verwendung von Blausepharose zur Enzymreinigung als ungeeignet erschien (3.12.1.), zeigte sich doch, daß mit diesem Säulenmaterial eine spezifische Reinigung der GPDH erreicht werden kann.

Im allgemeinen lassen sich Batch-Versuche im Reagenzglas gut für Vorversuche einsetzen, um Bindungs- und Desorptionsverhalten zu untersuchen. Offenbar kann aber das Verhalten der Proteine beim Durchlauf durch eine Säule stark von dem im Reagenzglas abweichen. Möglicherweise können auf einer Säule die schwächer gebundenen Proteine vorauslaufen und dadurch eine feste Bindung der zurückbleibenden Proteine ermöglichen. Andererseits sind bei Versuchen im Reagenzglas die Konzentrationen der Verbindungen, die für die Desorption notwendig sind, wesentlich geringer als auf der Säule. Hier spielt, wie eventuell auch bei der Bindung, vielleicht der Zeitfaktor eine Rolle, da bei den Versuchen im Reagenzglas normalerweise längere Zeiten zur Gleichgewichtseinstellung zur Verfügung stehen als an der Pufferfront auf der Säule.

Die ersten Ergebnisse auf der Blausepharose ergaben, daß unter den gewählten Bedingungen nicht die Bindung der GPDH, sondern ihre Desorption das Hauptproblem darstellte. In Abwesenheit von G-3-P wurden von dem Farbstoff offenbar weitere Bindungsstellen irreversibel oder mit hoher Affinität besetzt. Dabei ist auch eine Konformationsänderung des Enzyms denkbar. Wie das Verhalten der GPDH nach der Ionenaustauschersäule zeigte, nimmt die Aktivität des Enzyms in einer verdünnten Lösung rasch ab. Dieser Aktivitätsverlust kann durch Zusatz von G-3-P vermieden bzw. auch weitgehend wieder rückgängig gemacht werden (Tab. 8). Substratinduzierte Konformationsänderungen bzw. die Stabilisierung des Enzymproteins durch Substrat sind auch von anderen Enzymen bekannt (TEIPEL und KOSHLAND, Jr., 1971).

Daß durch das G-3-P eine Stabilisierung des Enzyms und nicht eine Veränderung stattfindet, ergibt sich daraus, daß bei Zusatz von G-3-P zum Rohextrakt keine zeitlichen Veränderungen der Aktivität beobachtet werden können, wie dies bei der Reaktivierung des Enzyms aus den Säuleneluaten zu beobachten war.

Das Elutionsverhalten der GPDH von der Blausepharose war stark von der G-3-P-Konzentration im verwendeten Puffer abhängig (Abb. 9-12). Um eine vollständige Desorption durch NAD zu erreichen, mußten sehr hohe Konzentrationen von G-3-P im Puffer verwendet werden. Diese Tatsache wurde zeitweilig zu einem Problem, da gerade zu dem Zeitpunkt, als die Methode endgültig erarbeitet worden war, DL-α-Glycerin-3-Phosphat kommerziell nicht mehr erhältlich war.

Aus diesem Grund wurden auch keine Versuche zur Weiterreinigung der GPDH, z.B. durch präparative Gelchromatographie, unternommen, da auch in diesem Falle große Mengen G-3-P zur Stabilisierung des Enzyms benötigt worden wären.

Die Lösung dieses Problems wurde durch weitere Optimierung der Chromatographie an Blausepharose erreicht. Sie führte schließlich zu befriedigenden Resultaten, so daß ein zusätzlicher spezifischer Reinigungsschritt nicht mehr notwendig wurde:

Eine Verringerung der NAD-Konzentration im Elutionspuffer von 20 mM auf 3 mM verbesserte die Spezifität der Elution erheblich. Allerdings wurde dadurch das Enzym in einem breiteren Volumenbereich eluiert. Damit war das Kriterium einer hohen Volumenaktivität nicht mehr erfüllt.

Die entscheidende Verbesserung der Reinigung konnte durch das "Überladen" der Säule erreicht werden. Dadurch wurde sowohl die Volumenaktivität des Eluats wie auch die spezifische Aktivität wesentlich erhöht (Abb. 13). Die objektiven Enzymverluste waren bei diesem Verfahren zwar sehr hoch, da ein großer Teil der Enzymaktivität mit dem Rohextraktdurchlauf verworfen werden mußte. Dieser Verlust spielte jedoch keine Rolle, da die Gewinnung größerer Mengen Rohextrakt kein Problem darstellte.

In den Eluaten der Blausepharose-Säule waren sowohl G-3-P und NAD wie auch die durch die GPDH umgesetzten Produkte DHAP und NADH vorhanden. Thermodynamisch liegt das Gleichgewicht der Reaktion G-3-P → DHAP zwar weit auf der Seite des G-3-P; auf Grund der hohen Konzentrationen im Puffer wurde aber dennoch ein merklicher Umsatz festgestellt.

Um eine möglichst kurze Reinigungszeit zu erzielen, wurde zunächst versucht, die Bindung der Substrate an DEAE-Sephadex auszunützen (3.14.). Eine zufriedenstellende Optimierung dieser Methode gelang jedoch aus verschiedenen Gründen nicht. Zum einen konnte die Menge des Ionenaustauschers, die zur Abtrennung von G-3-P aus der Enzymlösung benötigt wurde, nicht ohne weiteres über das gepackte Volumen des Austauschergels bestimmt werden. Es traten immer wieder Verluste der Enzymaktivität auf, da die GPDH ebenfalls gebunden wurde, wenn die Gesamtkapazität des verwendeten Gels zu groß war. Wahrscheinlich wurde auch schon Enzymprotein vor der vollständigen Abtrennung von G-3-P und DHAP gebunden. Zum anderen gelang es nicht, die Methode zufriedenstellend auch auf die kationischen Coenzyme anzuwenden. Eine Bindung der Coenzyme an Kationenaustauscher konnte unter pH-Bedingungen, die den Erhalt der Enzymaktivität gewährleisteten, nicht erreicht werden.

Bei einer teilweisen Abtrennung von G-3-P, die ohne Enzymverlust erreicht werden konnte, wurde eine Erhöhung der Gesamtaktivität, gemessen als DHAP-Reduktion, beobachtet. Der Anstieg der Enzymaktivität betrug bis zu 150 %. Er ist auf eine Verringerung der Produkthemmung nach Abtrennung von G-3-P zurückzuführen. Weiterhin wurde eine Verringerung des Proteingehalts auf durchschnittlich 1/3 des Ausgangswerts vor der DEAE-Sephadex-Behandlung beobachtet.

Im Batch-Verfahren mußte allerdings immer eine Verdünnung der Enzymlösung in Kauf genommen werden. Gepacktes DEAE-Sephadex A-25 enthält etwa 35 Vol.% Puffer. Zur Abtrennung von 200 mM G-3-P aus einer Enzymlösung wird in etwa das doppelte Volumen an gepakctem Gel benötigt. Demzufolge wird das Enzym in der Lösung auf die Hälfte verdünnt.

Zur Konzentrierung der verdünnten Enzymlösung hätte im Prinzip mit dem Einsatz von trockenem Sephadex (2.2.17.) eine hervorragende Methode zur Verfügung gestanden. Bei Einsatz von frischem Sephadex wurden mit partiell gereinigtem Enzym Ausbeuten von 95 % - 100 % erreicht. Diese Methode konnte allerdings bei der sehr empfindlichen gereinigten GPDH nicht eingesetzt werden, da bei einer Konzentrierung der Enzymlösung ohne gleichzeitige Anwesenheit des Stabilisators G-3-P eine sehr starke Inaktivierung des Enzyms erfolgte. Auch ein anderer Umstand machte die Enzymkonzentrierung durch trockenes Sephadex als Routinemethode nicht einsetzbar: Vor dem erneuten Gebrauch muß das Sephadex ausgewaschen und entsprechend den Herstellerangaben mit einer Ethanol-Wasser-Reihe mit steigendem Ethanolgehalt geschrumpft werden. Dabei zeigte sich, daß das Gel nach der Trocknung stets noch Spuren von Ethanol enthielt. Auch gründliches Auswaschen mit Ether, Durchsaugen von Luft durch das trockene Gel während 48 h oder längeres Evakuieren im Exsikkator konnten diese Spuren nicht beseitigen. Bei der Konzentrierungsprozedur wurde dann das Ethanol in die Enzymlösung ausgewaschen, was zu Ausbeuteverlusten von 60 % - 90 % führte.

Auf Grund dieser Probleme konnte die Ionenaustauschermetho-

de mit nachfolgender Konzentrierung weder zur Entfernung von G-3-P noch zur Abtrennung von Protein sinnvoll ausgenutzt werden.

Mit einer Sephadex G-50-Säule konnten Substrate und Coenzyme gleichzeitig aus den Eluaten der Blausepharose-Säule entfernt werden (3.17.). Die Dimensionierung der Säule wurde so gewählt, daß die unvermeidbare Verdünnung des Enzyms möglichst klein gehalten wurde. Bei den dabei erforderlichen großen Auftragsvolumina mußte jedoch eine geringe Überlappung von Protein- und Salzpeak in Kauf genommen werden. Durch enzymatische Bestimmung von G-3-P im Eluat konnte jedoch sichergestellt werden, daß in den gesammelten Enzymfraktionen keine Metabolite mehr vorhanden waren.

Bei der angegebenen Dimensionierung der Säule und des Auftragsvolumens trat demzufolge ein gewisser Enzymverlust auf: er betrug etwa 10 %. Es wurde jedoch eine weitere Steigerung der spezifischen Aktivität erreicht (Tabelle 9). Ein Anstieg der Enzymaktivität, wie im Batch-Verfahren mit DEAE-Sephadex, konnte jedoch bei der Gelfiltration nicht beobachtet werden. Dies ist sicher darauf zurückzuführen, daß die GPDH im allgemeinen die Tendenz zeigt, bei der Chromatographie an Sephadex-Gelen an Aktivität zu verlieren (WEINS, 1978).

Die Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen nach der Reinigung erhalten wurde, konnte bei den anschließenden enzymkinetischen Messungen im Laufe von etwa 2 h verbraucht werden. Während dieser Zeitspanne nahm die Aktivität des Enzyms im Eiswasserbad auf ca. 80 % der ursprünglichen Aktivität ab. Die Abnahme der Enzymaktivität während der Meßserien war mit der Zeit praktisch linear und konnte somit rechnerisch berücksichtigt werden.

Die schnelle Inaktivierung des Enzyms nach der Reinigung über Sephadex G-50 ist wahrscheinlich auf die sehr niedrige Proteinkonzentration von < 10 µg/ml zurückzuführen. Rinderserumalbumin in einer Konzentration von 1,5 mg/ml verringerte die Inaktivierung erheblich. Für die Enzymkinetikexperi-

mente wurde jedoch kein BSA zugesetzt, um Wechselwirkungen mit Substrat oder Coenzym bzw. dem Enzym selbst zu vermeiden.

Die in Tabelle 10 zusammengestellten Konstanten sind wahre K_M-Werte. Sie wurden durch Extrapolation $\rightarrow \infty$ für Substrat und Coenzym erhalten. Es fällt auf, daß der K_M für DHAP mehr als dreimal so hoch ist wie der für G-3-P, dem Substrat der Rückreaktion. Diese Tatsache scheint zunächst die Rückreaktion zu begünstigen. Allerdings geht aus der Tabelle auch hervor, daß der K_M für NADH um 2 Größenordnungen niedriger ist als der für NAD. Dies bedeutet, daß die Konzentration von NADH im Bereich des K_M 50-fach niedriger sein kann als die des NAD, um mit gleicher Affinität vom Enzym gebunden zu werden. Das Enzym erreicht also bei wesentlich niedrigeren Coenzym-Konzentrationen die maximale Umsatzrate bezüglich der Coenzymsättigung. Es wäre allerdings zu untersuchen, inwieweit der hohe K_M gegenüber DHAP eventuell nur eine Eigenschaft des gereinigten Enzyms ist. Im Rohextrakt konnte beim Aktivitätstest in Richtung DHAP-Reduktion durch Steigerung der DHAP-Konzentration über 0,7 mM keine Steigerung der Enzymaktivität festgestellt werden.

Die ermittelten Maximalgeschwindigkeiten für die Hin- und Rückreaktion waren für die jeweilige Reaktionsrichtung identisch, gleichgültig, ob sie aus den Diagrammen für die Substrat- oder für die Coenzymvariation extrapoliert worden waren.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konstanten sind nicht identisch mit den von BROWN et al. (1982) angegebenen Konstanten. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Konstanten in einem anderen Puffersystem ermittelt wurden. Außerdem wurden die Messungen nicht mit dem gereinigten Enzym, sondern mit dem Rohextrakt durchgeführt.

Um die physiologische Relevanz eines Effektors der GPDH für die osmoregulatorische Glycerinsynthese beurteilen zu können, ist die Kenntnis der Inhibitorkonstanten, der Hemmtypen und der Konzentrationen, die in vivo erwartet werden können,

notwendig: die Inhibitorkonstanten geben zusammen mit den in vivo Konzentrationen eine Vorstellung über das Ausmaß der Hemmung in vivo. Liegt z.B. die Inhibitorkonstante im Bereich der in vivo Konzentration des Effektors, resultiert eine relativ große Änderung der Enzymaktivität proportional zur Konzentrationsänderung des Effektors. Ist die Inhibitorkonstante wesentlich höher als die in vivo Konzentration des Effektors, resultiert bei dessen Konzentrationsänderung zwar ebenfalls eine Aktivitätsänderung des Enzyms; sie ist jedoch bei gleicher relativer Änderung der Effektorkonzentration wesentlich kleiner als im ersten Fall. Zusätzlich ist die Kenntnis des Hemmtyps erforderlich. Bei einer kompetitiven Hemmung z.B. würde bei einer Konzentrierung der Zellinhaltsstoffe unter osmotischer Belastung keine Veränderung der Enzymaktivität erfolgen, da Inhibitor und konkurrierendes Substrat in gleichem Ausmaß konzentriert werden.

Effektoren, die an der Regulation der GPDH bei der osmoregulatorischen Glycerinsynthese beteiligt sind, müssen den drei folgenden Kriterien genügen:

1. Die Konzentrationsänderung des Effektors muß eine ausreichend große Aktivitätsänderung der GPDH bewirken. Dabei muß, nach Ergebnissen von WEGMANN (1983), mit einer 2-3-fachen Erhöhung der Gesamtsyntheserate von Glycerin in der Anfangsphase der Osmoregulation gerechnet werden.
2. Für die Konzentrationsänderung des Effektors muß ein Mechanismus möglich sein, der die Konzentration in die richtige Richtung verändert; d.h. die Konzentration eines Inhibitors muß verringert, die eines Aktivators erhöht werden, wenn im Außenmedium der osmotische Druck ansteigt.
3. Der Einfluß des Effektors auf die GPDH darf nicht hell-dunkel kontrolliert sein, da die Syntheseraten und der zeitliche Verlauf der Glycerinsynthese im Licht und im Dunkeln gleich sind (WEGMANN, unveröffentlicht).

Für die Bestimmung der Konzentrationen von Adeninnucleotiden wurden von STITT et al. (1982) Untersuchungen an Weizen, unter anderem auch an Weizenblattchloroplasten, durchgeführt.

Diese Untersuchungen ergaben für AMP eine Konzentration von 0,3 - 0,4 mM im Chloroplasten (umgerechnet über die Angaben über Volumen:Chloroplasten-Verhältnis von HELDT, 1973).

Bei den vorliegenden Untersuchungen zeigte AMP eine kompetitive Hemmung der GPDH in Bezug auf NADH und eine nichtkompetitive Hemmung in Bezug auf DHAP (Abb. 15a und b). Die K_i-Werte von 3,6 mM bzw. 10 mM zeigen aber, bei den oben angegebenen in vivo Konzentrationen, daß AMP für eine Veränderung der GPDH-Aktivität bei der Osmoregulation nicht in Frage kommt.

Für ATP wird von STITT et al. (1982) eine Konzentration von 0,8 - 1,3 mM angegeben. In diesem Bereich zeigt der DIXON-Plot (Abb. 16) der GPDH einen Übergang von Aktivierung zu Hemmung. Daher scheint eine Regulation der Enzymaktivität durch ATP bei der Osmoregulation nicht sehr wahrscheinlich.

Für Phosphat wurde in der vorliegenden Arbeit eine Konzentration von 1 - 3 mM in den Algenzellen ermittelt. Dieser Bereich liegt nahe am K_i, der für Phosphat gegen DHAP ermittelt wurde. Veränderungen der Phosphatkonzentration in diesem Bereich könnten daher substantielle Änderungen der Enzymaktivität und damit der Glycerinsynthese hervorrufen. Dem steht jedoch gegenüber, daß unter identischen physiologischen Bedingungen eine starke Variation der Phosphatgehalte in den Algenzellen beobachtet wurde, ohne daß die Glycerinsynthese davon betroffen war (3.7.). Aus dem gleichen Versuch geht auch hervor, daß die Algen im Medium angebotenes Phosphat sehr rasch in den Zellen akkumulieren; ebenfalls, ohne daß z.B. ein Schrumpfen der Zellen durch verringerte Glycerinsynthese sichtbar wird.

Ein weiterer Grund spricht gegen Phosphat als Regulator der osmoregulatorischen Glycerinsynthese: da es als Inhibitor der GPDH wirkt, müßte sich seine Konzentration verringern, um eine erhöhte Glycerinsynthese zu ermöglichen. Es ist jedoch kein Mechanismus vorstellbar, der die Phosphatkonzentration während der Osmoregulation verringert. Es wurden zwar Unterschiede in den Phosphatgehalten von Algen aus un-

terschiedlichen Nährmedien gefunden (siehe 3.7.), diese Unterschiede sind jedoch bei osmotischer Belastung und im steady state praktisch gleich. Eine Abgabe ans Medium bei osmotischer Belastung liegt ebenfalls nicht vor; vielmehr nehmen auch die belasteten Zellen Phosphat aus dem Medium auf. Eine Festlegung des Phosphats in den Pools der Triose- oder Zuckerphosphate bei osmotischer Belastung ist ebenfalls nicht wahrscheinlich. In den ^{14}C-Markierungsexperimenten von FRANK und WEGMANN (1974) wurde im Gegenteil eine Abnahme der Poolgröße verschiedener Phosphatester unter osmotischer Belastung beobachtet.

Auch eine Änderung der Phosphatkonzentration zur Regulation über einen Austausch durch die Chloroplastenmembran ist nicht wahrscheinlich: Osmoregulation und Glycerinsynthese wurden auch an isolierten Chloroplasten beobachtet (WEGMANN und FRANK, unveröffentlicht). Der Chloroplast als Ort der Glycerinsynthese muß somit als autonom arbeitende Organelle im Mechanismus der Osmoregulation betrachtet werden. Aus den vorliegenden Gründen scheidet anorganisches Phosphat mit großer Sicherheit als Regulator der Osmoregulation aus. Aus demselben Grund scheidet auch ein an der Cytoplasmamembran lokalisierter Primärprozeß, wie er von CURTAIN et al. (1983) auf Grund von Lipidverschiebungen in der Membran diskutiert wurde, aus.

Der Einfluß unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen in vivo in der Algenzelle wird wahrscheinlich durch Kompartimentierung zwischen Cytoplasma und Chloroplast oder durch Festlegung des Phosphats in unlöslicher Form ausgeglichen. Im Chloroplasten wurden z.B. mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenanalyse sehr dichte, phosphatreiche Partikel im Chloroplasten nachgewiesen (K.WEGMANN, M.F.WENDT-GALITELLI, H.WOLBURG, in Vorbereitung). Eine endgültige Identifizierung steht zwar noch aus, es könnte sich aber um Phytin - also Myoinosithexaphosphat - handeln, das in höheren Pflanzen als Phosphatspeicher bekannt ist.

Von Fructosebisphosphat ist bekannt, daß damit die GPDH aus Säugetierzellen gehemmt wird (Boehringer biochemica infor-

mation II). Im Unterschied dazu beobachtete WEINS (1978) beim *Dunaliella*-Enzym eine Aktivierung durch FBP. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit zunächst nicht gestützt werden.Mit G-3-P als Substrat wurde eine Hemmung der Enzymaktivität gefunden, die der Hemmung durch Phosphat entsprach (3.20.3.). Die Reduktion von DHAP, die vom Enzym in vivo katalysiert wird, wurde dann allerdings durch FBP aktiviert (Abb.18).

Um bei der Osmoregulation eine entscheidende Rolle zu spielen, ist diese Aktivierung aber zu schwach; sie ist jedoch den physiologischen Notwendigkeiten sehr gut angepaßt. Da im Dunkeln bei osmotischer Belastung die Vorstufen für die Glycerinsynthese durch den Abbau von Reservestärke bereitgestellt werden, tritt FBP - sei es bei der Glykolyse oder im Pentose-Phosphat-Weg - zwangsläufig als Vorstufe für DHAP auf. Eine Aktivierung der GPDH durch dieses Zwischenprodukt ist daher höchst sinnvoll.

Der Abbau der Stärke über den von KWON u. GRANT (1971) bei *Dunaliella* nachgewiesenen Pentosephosphatweg wäre für die Alge besonders nützlich, da durch die Reaktion der G-6-PDH zugleich mit den Vorstufen auch ein Teil der in der GPDH-Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente bereitgestellt wird.

Eine Veränderung des pH-Werts im Chloroplasten dürfte bei der Osmoregulation prinzipiell keine Rolle spielen, da - wie schon erwähnt - dieser Mechanismus im Hellen wie im Dunklen prinzipiell gleichartig abläuft. Durch die Arbeiten von HELDT et al. (1973) ist bekannt, daß beim Hell-Dunkel-Wechsel eine obligatorische pH-Änderung im Chloroplasten induziert wird. Die bei den vorliegenden Untersuchungen festgestellten, ziemlich breiten pH-Optima (Abb. 19a und b) der GPDH in allen Puffersystemen könnten die Grundlage dafür bilden, daß die GPDH auch unter diesen Bedingungen keinen großen Aktivitätsschwankungen unterworfen ist.

Ein Faktor, dem zunächst keine große Bedeutung beigemessen wurde, erwies sich im Verlauf der pH-Untersuchungen als sehr

wesentlich. Die Konzentration des Testpuffers, wie auch der Zusatz verschiedener Salze, zeigten einen starken Einfluß auf die Aktivität der GPDH (Tab. 11-13). Die Erhöhung der Pufferkonzentration im Enzymtest von 50 mM auf 100 mM ergab eine Aktivitätssteigerung auf 160 %, der Zusatz von 100 mM KCl zu 100 mM Testpuffer eine Steigerung auf 180 % des jeweiligen Ausgangswerts. Alle anderen überprüften Ionen zeigten qualitativ den gleichen Effekt: Eine Erhöhung der Salzkonzentration hat eine Steigerung der Enzymaktivität zur Folge. Das Maximum der Aktivierung lag bei einer Salzkonzentration von 200 mM. Dieser Wert liegt um eine Größenordnung niedriger als die Gesamtkonzentration osmotisch wirksamer Substanzen im Außenmedium und in der Algenzelle. Hieraus, wie auch aus den Ergebnissen von Versuch 3.23. muß geschlossen werden, daß der Effekt ein Salzeffekt und nicht ein osmotischer Effekt ist. Beim Vorliegen eines osmotischen Effekts müßte die Glycerinsyntheserate einen sigmoiden Verlauf, hervorgerufen durch Selbstaktivierung der Reaktionssequenz, zeigen. Dies ist jedoch nicht der Fall (WEGMANN, 1983).

Auf der Grundlage der Regulation der GPDH durch die Salzkonzentration kann eine Erklärung des Mechanismus der Osmoregulation gegeben werden:

Die Salzkonzentration in der Algenzelle im osmotischen steady state entspricht etwa der Konzentration eines 50 mM TRIS/ Isolationspuffers. Dies konnte aus Leitfähigkeitsmessungen von Rohextrakten beim Aufschluß der Algen in verschiedenen Puffersystemen geschlossen werden. Die Leitfähigkeit des Rohextrakts in 50 mM Puffer ist praktisch identisch mit der Leitfähigkeit des Puffers selbst, während beim Aufschluß in 100 mM Puffer im Rohextrakt eine geringere Leitfähigkeit gemessen wurde als im Puffer - der Puffer wurde durch den Zellsaft verdünnt. Beim Aufschluß der Zellen in 20 mM Puffer ist die Leitfähigkeit im Rohextrakt erheblich größer als im reinen Puffer. Es war eine 4-fache Verdünnung des Rohextrakts mit H_2O erforderlich, um die Leitfähigkeit des 20 mM Puffers zu erreichen.

Die Konzentration dissoziierter Ionen beträgt im 50 mM TRIS/Isolationspuffer pH 8,2 etwa 35 mM. Dieser Wert liegt in einem Bereich, in dem eine 2-3-fache Konzentrationsänderung eine Aktivierung der GPDH hervorrufen kann, die für die erhöhte Glycerinsynthese während der Osmoregulation verantwortlich sein kann.

Dieser Befund erfüllt somit das erste der Kriterien, die oben für regulierende Effektoren der GPDH aufgestellt worden sind.

Für das zweite Kriterium, eine mit dem osmotischen Druck im Außenmedium gekoppelte Veränderung der Effektorkonzentration, kann ein sehr einfaches Modell vorgestellt werden: Die niedrige in vivo Konzentration von Salzen in der Zelle im osmotischen steady state ist in Übereinstimmung mit einer relativ niedrigen GPDH-Aktivität und einem niedrigen steady state Durchsatz durch den Glycerin-Zyklus.

Ein Anstieg der Osmolarität im Außenmedium bewirkt durch Wasserentzug aus der Zelle einen Konzentrationsanstieg aller gelösten Substanzen in der Zelle, also auch der Salze. Wie die Bestimmung des osmotischen Volumens der Algenzellen gezeigt hat, resultiert eine Steigerung der Salzkonzentration im Außenmedium von 6 % auf 10 % in einer etwa 2-fachen Konzentrierung der Zellinhaltsstoffe.

Die innere Membran der Chloroplasten muß als praktisch impermeabel für Kationen angenommen werden (GIMMLER et al. 1975), und, mit wenigen Ausnahmen, auch für Anionen (HELDT, 1976). Die Anionen, für die die Membran eine gewisse Permeabilität besitzt, könnten jedoch nur im elektrochemischen Gleichgewicht die Membran passieren, also zusammen mit den impermeablen Kationen.

Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß durch den primären Anstieg der Konzentration im Cytoplasma auch der Chloroplast schrumpft(GIMMLER et al., 1975). Dadurch wird auch im Chloroplasten, dem Ort der Glycerinsynthese, die Salzkonzentration erhöht. Die Erhöhung kann nun die GPDH aktivieren und eine verstärkte Glycerinproduktion in Gang setzen. Auf Grund

des hohen K_M-Wertes der Glycerindehydrogenase für Glycerin und die im Vergleich zur GPDH niedrige Aktivität (nach BROWN et al. 1982, etwa 1/3 der GPDH-Aktivität) fließt das gebildete Glycerin nur langsam in den Stoffwechsel zurück. Es kann somit akkumuliert werden, bis ein neuer osmotischer steady-state erreicht ist. In diesem Fall hat die Zelle ihre alte Größe wieder erreicht und die Salzkonzentration im Inneren ist wieder auf den steady-state-level abgesunken. Damit entfällt auch die Aktivierung der GPDH, und das Enzym geht in seinen relativ inaktiven Ausgangszustand zurück.

Weitere Unterstützung erhält dieses Regulationsmodell durch die Untersuchungen von BOROWITZKA & BROWN (1973). Sie wollten feststellen, ob *Dunaliella*-Enzyme halophil sind und untersuchten dazu unter anderem die Aktivität der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und der Glycerin Dehydrogenase aus *Dunaliella tertiolecta* im Bereich von 0 - 3 M NaCl. Die genauere Betrachtung ihrer Ergebnisse zeigt, daß die G-6-PDH zwar bei hohen Salzkonzentrationen gehemmt wird, im Bereich von 0 - 200 mM NaCl jedoch - wie die GPDH - aktiviert wird. Bei Anwendung des in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Regulationsmodells bedeutet dies, daß beim Abbau von Reservestärke über den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg die Produktion von DHAP, dem Substrat der GPDH, durch das Schrumpfen der Algenzelle bei osmotischer Belastung erhöht wird. Dadurch wird die Geschwindigkeit der GPDH-Reaktion zusätzlich zur Aktivierung des Enzyms erhöht.

Bei der Glycerindehydrogenase fanden BOROWITZKA & BROWN schon bei niedrigen Salzkonzentrationen eine starke Inaktivierung. In dem vorgeschlagenen Modell wird dadurch bei osmotischer Belastung die Wiederverwendung des gebildeten Glycerins verlangsamt und somit die Akkumulation des Osmotikums unterstützt.

Der Befund, daß verschiedene Enzyme bei Erhöhung der Salzkonzentration im Zellinneren im Bereich zwischen 30 und 200 mM ihre Aktivität in der Weise verändern, daß die Glycerinanhäufung in der Zelle gefördert wird, macht es sehr wahrscheinlich, daß die Osmoregulation in *Dunaliella tertiolecta*

mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit dargestellten Modells gesteuert wird.

Die Glycerinphosphatdehydrogenase spielt in diesem Regulationsmechanismus wenn nicht die, so doch eine entscheidende Rolle für die osmoregulatorische Glycerinsynthese.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die begeißelte einzellige Meeresalge *Dunaliella tertiolecta* besitzt einen sehr großen Toleranzbereich gegenüber Veränderungen der Salzkonzentration im Medium (16 mM bis 5,6 M). Die Toleranz ist dabei nicht auf NaCl beschränkt. Zur Aufrechterhaltung des Zellvolumens und damit der Konzentration der Zellinhaltsstoffe bei wechselnder Salinität des Mediums besitzt die Alge einen speziellen Regelmechanismus, bei dem über den Glycerin-Cyclus die Konzentration des als Osmotikum wirkenden Glycerins im Zellinneren variiert werden kann. Der eigentliche Mechanismus dieser Osmoregulation, d.h. die Umsetzung eines physikalischen Reizes (osmotischer Druck) auf die biochemische Ebene (Enzymregulation) ist bisher noch nicht bekannt.

- Die Gründe für die Annahme, daß die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase wesentlich an der Regulation des Glycerincyclus beteiligt ist, werden an Hand der bisher bekannten Ergebnisse diskutiert.
- Es wurde eine schnelle 2-Schritt-Reinigung der Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase mittels Affinitätschromatographie an Cibacronblau-Sepharose mit anschließender Gelfiltration entwickelt.
- Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt.
- Auf Grund der bisher bekannten Ergebnisse werden Kriterien für regulierende Effektoren des Glycerincyclus und speziell der GPDH aufgestellt.
- Durch Bestimmung der Phosphatgehalte von Algenzellen aus verschiedenen Medien sowie durch enzymkinetische Untersuchungen konnten anorganisches Phosphat, AMP, ATP und FBP weitgehend als regulierende Effektoren ausgeschlossen werden.
- Es wurde ein starker Einfluß der Salzkonzentration im Bereich kleiner als 200 mM auf die Aktivität der GPDH gefun-

den. Es konnte gezeigt werden, daß der Einfluß nichtionischer Osmotika (Mannit) gegenüber dem Salzeffekt unwesentlich ist.

- Ausgehend von diesen Befunden wurde ein Regulationsmodell für die Glycerinsynthese unter osmotischem Streß entwikkelt, das mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren im Einklang steht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Baranowski, T. 1949. Crystalline Glycerophosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J. Biol. Chem. 180, 535-541

Barr, R., Troxel, K.S., Crane, F.L. 1982. Calmodulin antagonists inhibit electron transport in photosystem II of spinach-chloroplasts. Biochem Biophys. Res. Comm. 104/4, 1182-1188

Bassham, J.A., Krause, G.H. 1969. Free energy charges and metabolic regulation in steady state photosynthetic carbon reduction. Biochim. Biophys. Acta 129, 207-221

Ben-Amotz, A., Avron, M. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga Dunaliella parva. Plant Physiol. 51, 875-878

Ben-Amotz, A. 1975. Adaption of the unicellular alga Dunaliella parva to a saline environment. J. Phycol. 11, 50-54

Ben-Amotz, A., Sussman, I., Avron, M. 1982. Glycerol production by Dunaliella. Experientia 38, 49-52

Ben-Amotz, A., Avron, M. 1982. The potential use of Dunaliella for the production of glycerol,ß-carotene and high-protein feed. in: San Pietro, A. (ed.): Biosaline research: a work to the future, 207-214. Plenum Publ. Comp.

Bernardi, G. 1971. Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite columns. Methods in Enzymology 21, 95-139

Bernfeld, P., Berkeley, B.J., Bieber, R.E. 1965. Reversible dissociation of enzymes at high dilutions and their inhibition by polyanions. Arch. Biochem. Biophys. 111, 31-38

Bisswanger, H. 1979. Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim. ISBN 3-527-25845-0

Borowitzka, L.J., Brown, A.D. 1973. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga Dunaliella. The role of glycerol as a compatible solute. Arch. Microbiol. 96, 37-52

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the prinziples of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Brown, A.D., Simpson, J.R. 1972. Water relations of sugar tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. J. Gen. Microbiol. 72, 589-591

Brown, A.D., Lilley, R.McC., Marengo, T. 1982. Osmoregulation in Dunaliella. Intracellular distribution of enzymes of glycerol metabolism. Z. Naturf. 37c, 1115-1123

Curtain, C.C., Looney, F.D., Regan, D.L. 1983. Changes in the ordering of lipids in the membrane of Dunaliella in response to osmotic-pressure changes. An e.s.r. study. Biochem. J. 213, 131-136

Fiske, C,H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400

Frank, G., Wegmann, K. 1974. Physiology and biochemistry of glycerol biosynthesis in Dunaliella. Biol. Zbl. 93, 707-723

Gimmler, H., Schäfer, G., Heber, U. 1975. Low permeability of the chloroplast envelope against cations. in: Proceedings of the third international congress on photosynthesis, Avron, M. (ed.) Vol. II pp 1381-1392. Elsevier scientific publishing company, Amsterdam. ISBN 0-444-41311-1

Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G. 1973. Alkalization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. Biochim. Biophys. Acta 314, 224-241

Heldt, H.W. 1976. Metabolite transport in spinach chloroplasts. The intact chloroplast, Barber, J. ed.: 215-234. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-4444-1451-7

Heppel, L.A., Hilmoe, R.J. 1955. 5'-Nucleotidases. Methods in Enzymology II, 546-550

Kauss, H. 1982. Biochemistry of volume control on Poterioochromonas. in: Marmé, D., Marrè, E., Hertel, R. (eds.): Plasmalemma and tonoplast: their functions in the cell, 255-262. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam

Kauss, H. 1983. Volume regulation on Poterioochromonas. Involvement of calmodulin in the Ca^{2+}-stimulated activation of isofloridoside-phosphate synthase. Plant Physiol. 71, 169-171

Kombrink, E., Wöber, G. 1980. Preparation of intact chloroplasts by chemically induced lysis of the green alga Dunaliella marina. Planta 149, 123-129

Kwon, Y.M., Grant, B.F. 1971. Assimilation and metabolism of glucose by Dunaliella tertiolecta I. Uptake by whole cells and metabolism by cell free systems. Plant Cell Physiol. 12, 29-39

Lerner, H.R., Sussman, I., Avron, M. 1980. Characterization and partial purification of dihydroxyacetone kinase in Dunaliella salina. Biochim. Biophys. Acta 615, 1-9

Röbbelen, G. 1957. Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbenmutanten von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Z. ind. Akt. Vererb.-Lehre 88, 189-252

Santora, G.T., Gee, R., Tolbert, N.E. 1979. Isolation of a sn-glycerol-3-phosphate NAD oxidoreductase from spinach leaves. Arch. Biochem. Biophys. 196, 403-411

Stitt, M., Lilley, R.McC., Heldt, H.W. 1982. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts and mitochondria of wheat protoplasts. Plant Physiol. 70, 971-977

Sussman, I., Avron, M. 1981. Characterization and partial purification of D,L-glycerol-1-phosphatase from Dunaliella salina. Biochim. Biophys. Acta 661, 199-204

Teipel, J.W., Koshland, Jr., D.E. 1971. Kinetic aspects of conformational changes in Proteins. I. Rate of regain of enzyme activity from denatured proteins. Biochemistry 10, 792-798

Teipel, J.W., Koshland, Jr., D.E. 1971. Kinetic aspects of conformational changes in proteins. II. Structural changes in renaturation of denatured proteins. Biochemistry 10, 798-805

Thomson, W.W. 1975. The structure and function of salt glands. in: Poljakoff-Mayber, A., Gale, J. (eds.): Plants in saline environments (Ecol. studies 15), 118-146. Springer Verlag, Heidelberg

Wegmann, K. 1968. Der Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese und Dunkelfixierung in Dunaliella spec. Diss. Tübingen

Wegmann, K. 1969. On the pathways of CO_2 fixation in Dunaliella. Progress in photosynthetic research. Metzner, H. (ed.). Vol. III, 1559-1564

Wegmann, K. 1971. Osmotic regulation of photosynthetic glycerol production in Dunaliella. Biochim. Biophys. Acta 234, 317-323

Wegmann, K. 1978. Energetics and structure of halophilic microorganisms. Caplan, S.R., Ginzburg, M. (eds.): 537. Elsevier Biomed. Press. Amsterdam.

Wegmann, K., Ben-Amotz, A., Avron, M. 1980. Effect of temperature on glycerol rentention in the halotolerant algae Dunaliella and Asteromonas. Plant Physiol. 66, 1196-1197

Wegmann, K. 1981. Influence of ecological factors on the carbon metabolism in Dunaliella tertiolecta. in: Akoyunoglou, G. (ed.): Photosynthesis VI, 263-272. Balaton Int. Sci. Serv., Philadelphia

Wegmann, K. 1983. Osmotische Regulation des Stoffwechsels bei Algen. in: Kinzelbach, R., Verh. d. Ges. f. Ökol. (Mainz, 1981) 10, 529-536

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Professoren und Dozenten:

Anatomie:	K. Mörike
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff
Botanik:	H. Metzner
Mathematik:	W. Schweizer
Mikrobiologie:	H. Zähner
Organische Chemie:	H. Bayer, E. Müller
Pflanzenphysiologie:	H. Metzner, H. Ninnemann, K. Wegmann
Physik:	H. Krüger
Physikalische Chemie:	H.Mauser, D. Oelkrug
Physiologische Chemie:	G. Weitzel, D. Mecke, U. Weser
Toxikologie:	H. Remmer
Zoologie:	K. Grell

Lebenslauf

Am 22.6.1947 wurde ich, Manuel Haus, als Sohn der ehemaligen Lehrerin und Hausfrau Margret Haus, geb. Stierlin, und ihrem Ehemann, dem Geologen Dr. Heinrich Alfons Haus in Hammelburg geboren.
Ab Frühjahr 1954 besuchte ich die Volksschule, ab Frühjahr 1958 das math. nat. Gymnasium in Überlingen/Bodensee, wo ich im Herbst 1966 das Abitur ablegte.
Von Januar 1967 bis April 1968 leistete ich meinen Grundwehrdienst in Bad Reichenhall und in Pocking/Niederbayern ab.
Ab SS 1968 war ich im Fach Biochemie an der Universität Tübingen immatrikuliert.
Im WS 1968/69 legte ich den 1. Teil, im WS 1971/72 den 2. Teil der Diplomvorprüfung ab.
Im SS 1975 legte ich die mündliche Prüfung zur Diplomhauptprüfung ab.
Vom WS 1975 bis zum SS 1977 fertigte ich meine Diplomarbeit mit dem Thema: "Untersuchung zum Aminosäurestoffwechsel des Erregers einer experimentellen Nagetiermalaria (P. vinckei)" unter der Anleitung von Dr. A. Jung am Physiol. Chem. Institut an.
Dabei war ich vom 1.10.1976 bis 31.12.1977 als wiss. Hilfskraft im Tierstall des Instituts beschäftigt.
Seit der Geburt meiner beiden ersten Kinder Julia und Luis Hartmann am 29.9.1976 war ich halbtags mit deren Betreuung beschäftigt, da meine Lebensgefährtin und Mutter meiner Kinder, Frau Dr. Sybille Hartmann, während ihrer Promotionsarbeit am Physiol. Chem. Institut genötigt war, regelmäßig mindestens 8 Stunden täglich anwesend zu sein.
Ab 1.10.1978 fertigte ich meine Dissertation mit dem Titel: "L-Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.8) aus Dunaliella tertiolecta und ihre Bedeutung für die Osmoregulation der Glycerinsynthese" unter der Anleitung von Prof. Dr. K. Wegmann an, die ich im März 1983 abschloß.
Dabei war ich vom 1.10.1978 bis 30.9.1982 halbtags als wiss. Angestellter beschäftigt.
Am 27.5.1980 wurde meine Tochter Flurina Hartmann geboren.
Da aus finanziellen Gründen auch Frau Dr. Hartmann während der gesamten Zeit halbtags beschäftigt war, war ich auch während meiner Promotionsarbeit teilweise an der Betreuung meiner Kinder beteiligt.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45